



FACULDADE DE CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO E ALIMENTAÇÃO
UNIVERSIDADE DO PORTO

Desenvolvimento de Sensores Colorimétricos para Despiste de Antibióticos em Alimentos

Ana Isabel Silva

Porto

Julho 2016

Mestrado em Alimentação Coletiva

**Desenvolvimento de Sensores Colorimétricos
para Despiste de Antibióticos em Alimentos**

Ana Isabel Faria Leite Silva

Orientador: Doutora Goreti Sales

Co-orientador: Mestre Helena Gomes

Agradecimentos

Ao terminar esta etapa é fundamental mostrar a minha gratidão para com todos os que, de algum modo, contribuíram para que isso fosse possível.

À minha mãe, por todo o amor, por me apoiar sempre e por poder contar sempre com ela para tudo.

À minha irmã, por ser o meu exemplo de determinação e luta, por me encorajar a seguir sempre o melhor caminho.

Ao meu pai, que infelizmente não está comigo, mas que sei que algures estará orgulhoso e que todos os dias olha por mim.

À minha avó materna, e à restante família, por me terem ajudado a crescer e por todos os ensinamentos ao longo da vida.

À minha orientadora, Dra. Goreti Sales, pela disponibilidade, opiniões e ajuda que me guiaram na elaboração deste trabalho.

À minha co-orientadora e amiga, Helena Gomes, pelo apoio e incentivo na realização deste projeto. Foi sem dúvida, o empurrão que precisava para concluir este ciclo de estudos.

Aos meus professores, da Faculdade de Ciências da Nutrição do Porto, pela ajuda prestada e pela disponibilidade.

Às minhas colegas da BioMark, sempre disponíveis para ajudar quando precisei.

Aos meus amigos, pela paciência, pelos desabafos e incentivos nesta fase. Obrigado por fazerem parte da minha vida e por estarem sempre presentes quando mais preciso.

Um sincero obrigada a todos!

Resumo

O consumo de pescado tem aumentado gradualmente, por ser um alimento considerado saudável. Uma grande parte do pescado é obtido pela pesca, levando à diminuição das populações selvagens e à subsequente necessidade de encontrar alternativas económicas e ambientalmente viáveis, como a aquacultura. Contudo, a produção intensiva de peixes em cativeiro requer o uso de drogas veterinárias, como antibióticos, que acarretam alguns riscos para a saúde pública, nomeadamente para os consumidores de pescado em unidades de alimentação coletiva. Além disso, o uso de antibióticos em aquacultura pode contribuir para o aparecimento de estirpes multirresistentes.

O principal objetivo deste trabalho foi, por isso, o desenvolvimento de um sensor para a deteção de antibióticos no meio aquático ou alimentos, utilizando um material inovador e de baixo custo, que permitisse implementar a análise da amostra no local da colheita. O material escolhido para este efeito foi o Rayon, presente nas zaragatoas. Este material foi sensibilizado a um fármaco através da sua modificação com uma espécie metálica, que mudou de cor quando na presença do mesmo; a intensidade da cor foi relacionada, ainda, com a concentração desse fármaco na amostra analisada. O fármaco escolhido para prova de conceito foi a clortetraciclina, um dos antibióticos mais usados em aquacultura.

A modificação do Rayon baseou-se na introdução de uma monocamada aminada sobre a superfície de glucose presente, através da qual as espécies metálicas puderam ligar-se por complexação. Estas modificações foram acompanhadas por *Fourier Transformed Infrared Spectroscopy* (FTIR) com acessório de *Attenuated Total Reflectance* (ATR) e otimizadas com base na intensidade/variação de cor formada quando na presença de soluções padrão de clortetraciclina, monitorizadas por comparação visual e por comparação de coordenadas de cor da imagem digital. Foi ainda constituída uma relação linear entre coordenadas de cor e concentração, e testou-se a sensibilidade do sensor a outros antibióticos. O material sensor foi aplicado em amostras de água de aquário dopadas com antibiótico e em amostras de alimento (truta de aquacultura e frango de aviário).

O sensor desenvolvido permitiu estabelecer um método simples, de baixo custo e de uso local, para quantificar a clortetraciclina em águas e alimentos. A zaragatoa modificada é mergulhada na amostra por um tempo determinado e a sua cor comparada com o gradiente de cor gerado por soluções padrão.

Palavras-chave: Antibióticos, Aquacultura, Alimentos, Rayon, Sensor.

Abstract

While fish products consumption is growing, mainly because it is considered to be healthy, the capture of wild fish is not sufficient to comply with human's needs in this regard. Viable economic and environmental measures include aquaculture, which is currently one of the fastest growing food-production sectors. However, intensive farming of fish inside small tanks has led to the appearance of diseases that need drug control. In this context, antibiotics are commonly used in aquaculture, posing increased concerns in public health, including fish consumers in food service units.

The main goal of this work was to develop a sensor for drug detection in aquatic environment and/or food, using a low-cost material never tested before that would allow implementing on-site sample analysis. The material selected for this purpose was Rayon, present in swabs. Rayon was sensitized to an antibiotic by binding to it a metal species that can change color in the presence of the drug; the color intensity may also be related to the antibiotic concentration. As proof-of-concept, chlortetracycline was selected as target antibiotic, which is among the most frequently used antibiotics in aquaculture.

The modification of Rayon was made by self-assembling an amine monolayer, to which metallic species may complex. These modifications were followed by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) equipped with an Attenuated Total Reflectance (ATR) accessory and optimized by comparing the color intensity/variations observed by naked eye or by a digital image collected by a camera. A linear correlation was further established, between the color coordinates and the antibiotic concentration. The sensory materials were applied to the analysis of aquarium water and food samples (aquaculture trout and aviary chicken).

Overall, this work provided a simple and effective procedure, using a low-cost material, for on-site chlortetracycline detection in water and food. The modified swab is dipped into the sample for a given time and its color compared to a color gradient generated by standard solutions.

Keywords: Antibiotics, Aquaculture, Rayon, Food, Sensor

Índice

1.	Introdução	1
1.1.	Aquacultura	1
1.2.	Aquacultura e Alimentação Coletiva	3
1.3.	Compostos usados em Aquacultura	4
	Antibióticos em Aquacultura	5
	Segurança Alimentar e Resistência aos Antibióticos	5
	Tetraciclina	9
1.4.	Métodos Analíticos para Tetraciclina	9
	Técnicas Microbiológicas	10
	Técnicas Separativas	11
	Técnicas Eletroanalíticas	11
	Técnicas Óticas	12
1.5.	Modelos de cores	13
1.6.	Considerações Gerais	15
2.	Descrição Experimental	17
	Concentração de APTES	19
	Pré-tratamento do Rayon	19
	Tempo de reação da imobilização da espécie metálica	19
	Temperatura de reação da imobilização da espécie metálica	19
	Concentração de espécie metálica imobilizada	20
	Tempo de reação de APTES	20
3.	Resultados e Discussão	23
	(a) Concentração de APTES	30
	(b) Pré-tratamento do Rayon	32
	(c) Tempo de reação	34
	(d) Temperatura	35
	(e) Concentração da espécie metálica	36
	(f) Tempo de reação do APTES	37
4.	Conclusões e Trabalhos Futuros	50
	Referências Bibliográficas	52
	ANEXO A	56
	ANEXO B	60
	ANEXO C	63

Índice de Figuras

Figura 1. 1- Percentagem de pescado adquirido pelas unidades de restauração em França, no ano de 1998.	3
Figura 1. 2- Estrutura Química da Tetraciclina.	9
Figura 1.3- Modelo RGB.	14
Figura 1. 4 -Tonalidade, Luminosidade e Saturação.	14
Figura 1.5- Fibras de Rayon.	16
Figura 3.1- Processo de modificação do Rayon.	27
Figura 3.2- Espectros de FTIR relativos às modificações ocorridas no Rayon para a reação entre o Rayon e o APTES.	38
Figura 3.3- Curva de calibração do sensor APTES/Cu ²⁺ /CTC	42
Figura 3.4 - Sobreposição das concentrações determinadas para a amostra dopada de água de aquário na curva de calibração do material sensor APTES/CU ²⁺ otimizado.	46
Figura 3.5- Sobreposição da concentração determinada para a amostra dopada de frango de aviário na curva de calibração do material sensor APTES/CU ²⁺ otimizado.	47
Figura 3.6 - Sobreposição da concentração determinada para a amostra dopada de truta de aquacultura na curva de calibração do material sensor APTES/CU ²⁺ otimizado.	47

Índice de Tabelas

Tabela1.1 Grupos de antibióticos associados ao aparecimento de estirpes microbianas resistentes e a sua relevância no contexto da clínica humana	6
Tabela 3.1 - Cores das soluções das espécies metálicas, antes e depois da adição de CTC.	24
Tabela 3.2 - Cores dos sensores obtidas após modificação do Rayon com APTES e posterior incubação em duas concentrações de CTC.	28
Tabela 3.3- Cores dos sensores obtidas após modificação do Rayon com Cisteamina e posterior incubação em duas concentrações de CTC.	28
Tabela 3.4 - Cores observadas para o material sensor APTES/Cu ²⁺ , preparado com diferentes concentrações de APTES.	30
Tabela 3.5 - Cores observadas para o material sensor APTES/Fe ³⁺ , preparado com diferentes concentrações de APTES.	31
Tabela 3.6 - Cores observadas para o material APTES/Cu ²⁺ e APTES/Cu ²⁺ /CTC (1,0×10 ⁻³ mol/L de CTC) sujeito a pré-tratamento por lavagem.	33
Tabela 3.7 - Evolução de cores do material sensor APTES/Cu ²⁺ , com diferentes tempos de reação entre o Rayon modificado com APTES e o Cu ²⁺	34
Tabela 3.8 - Evolução de cores do material sensor APTES/Cu ²⁺ , com diferentes temperaturas de incubação entre o Rayon modificado com APTES e o Cu ²⁺	36
Tabela 3.9- Evolução de cores do material sensor APTES/Cu ²⁺ com e sem CTC, para diferentes concentrações de Cu ²⁺ a reagirem com o Rayon modificado com APTES.	36
Tabela 3.10- Evolução de cores do material sensor APTES/Cu ²⁺ com e sem CTC, para diferentes tempos de reação entre o Rayon modificado e o APTES.	37
Tabela 3.11- Cores dos sensores APTES/Cu ²⁺ /CTC com concentrações diferentes de CTC (região assinalada relativa à zona de leitura das coordenadas HSL no programa Paint).....	40
Tabela 3.12- Média das coordenadas de cor obtidas da imagem dos sensores APTES/Cu ²⁺ incubados em diferentes concentrações de CTC.	41
Tabela 3.13 - Resposta corada do material sensor APTES/Cu ²⁺ a outros antibióticos.....	43
Tabela 3.14 - Resposta colorimétrica do material sensor à presença de CTC em amostras ambientais e de alimentos dopadas, com a correspondente concentração calculada via curva de calibração anterior.	45
Tabela A.1- Modificação do Rayon.....	57
Tabela A.2- Tempo de contacto com a espécie metálica.....	58
Tabela B.1 - Recolha de pontos aleatórios para cálculo da média das coordenadas de cor.	61
Tabela C.1- Cálculo da concentração da amostra experimental da água do aquário.....	64
Tabela C.2- Cálculo da concentração da amostra experimental do frango de aviário.	65
Tabela C.3- Cálculo da concentração da amostra experimental da truta de aquacultura.	66

Lista de Abreviaturas

ADN - Ácido desoxirribonucleico

APTES - 3-aminopropil-trietoxisilano

ATR - Attenuated Total Reflectance

CTC – Clortetraciclina

FTIR - Fourier Transformed Infrared Spectroscopy

HCl - Ácido clorídrico

HEPES - Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil] etanosulfónico

H₂SO₄ – Ácido sulfúrico

NaOH – Hidróxido de Sódio

RNA - Ácido ribonucleico

CMYK – Cyan, Magenta, Yellow and Black (Key)

RGE – Red, Green and Blue

HSB – Hue, Saturation, Brightness, ou tonalidade, saturação e brilho

HSL – Hue, Saturation, and Lightness, ou tonalidade, saturação e luminosidade

HPLC – High performance liquid chromatography

PVC – Policloreto de vinila

UV-VIS – Ultravioleta-visível

1. Introdução

1.1. Aquacultura

O peixe faz parte dos hábitos alimentares da população mundial, principalmente por serem alimentos considerados saudáveis e importantes fontes de proteína e de outros nutrientes essenciais [1].

A grande parte do peixe consumido é obtido por captura, levando à diminuição das populações selvagens do mesmo. Neste contexto surge a necessidade de encontrar alternativas à produção de pescado [2]. A aquacultura é uma alternativa com importante papel socioeconómico, nomeadamente na criação de emprego, na utilização mais eficiente dos recursos locais e na criação de oportunidades de investimento produtivo [3].

A aquacultura define-se como a produção em cativeiro de animais (peixes, moluscos, crustáceos, entre outros) ou plantas que tenham um habitat predominantemente aquático, em pelo menos uma fase da sua vida. A produção destes seres vivos implica a sua propagação, manutenção e colheita em ambientes controlados. Para que se considere que um produto tem origem na aquacultura é essencial que durante o seu ciclo de vida este seja alvo de intervenção por parte do Homem. Os principais intuitos são: o aumento da produção através da alimentação artificial, a proteção contra predadores, a agregação com outras espécies ou o controlo populacional [2].

A aquacultura foi impulsionada por um aumento na procura de peixe e marisco frescos e por uma diminuição dos recursos naturais da pesca, representando, atualmente, cerca de 50% do pescado produzido globalmente para alimentação humana [1].

A União Europeia é o terceiro maior produtor de pescado a nível mundial, correspondendo a Portugal cerca de 8 mil toneladas de produção anual (dados referentes ao ano de 2010) [4]. Em Portugal, os produtos da pesca por captura e de aquacultura têm uma enorme importância visto sermos o maior consumidor de pescado da União Europeia, com uma disponibilidade/consumo *per capita* (quantidade disponível por pessoa) de aproximadamente 57 kg/ano [5].

Existem variadas formas de classificar as técnicas e tipos de aquacultura, sendo normalmente divididas em: extensiva ou intensiva; água doce ou marinha, em meio natural ou em tanques [6]. A aquacultura realizada em águas marinhas, a maricultura, recorre ao uso de jaulas, em alto mar, ou tanques (em terra), onde os animais estão inseridos numa zona em condições controladas. Esta produção pode ser realizada de forma extensiva (em que se recorre exclusivamente aos recursos naturais para a alimentação dos animais), semi-intensiva (o Homem contribui em parte na alimentação dos animais) ou intensiva (animais dependentes apenas da alimentação artificial) [7].

A aquacultura em água doce, piscicultura, pode ser realizada em lagos/lagoas naturais ou artificiais, em que os meios podem ser tratados para beneficiar a fauna aquática. Nestes sistemas a população tem uma baixa densidade e a produção é do tipo extensivo. No entanto, em alguns casos, pode ser dado um complemento alimentar pelo produtor, sendo então um modo de produção semi-intensivo. Atualmente, o modo de produção intensivo, tem vindo a ser o mais utilizado, uma vez que este permite gerar um maior rendimento [7].

As técnicas de cultivo que são mais utilizadas implicam a recirculação da água, isto é, a água mantém-se num circuito fechado, para ser tratada, reciclada e reutilizada, ou o escoamento contínuo, onde os tanques alimentados por um desvio de água do rio a montante, e o fluxo contínuo passa uma vez só no sistema de produção, sendo então restituída a jusante, após ser utilizada e tratada [7].

A recirculação tem vantagens em relação ao escoamento contínuo, no que diz respeito à poupança e controlo de qualidade da água, havendo um reduzido impacto ambiental. As suas desvantagens são os elevados custos de investimento e manutenção e, por vezes, a impossibilidade de eliminar possíveis agentes patogénicos [7].

A piscicultura por escoamento contínuo continua a ser a mais usada, sendo a mais vantajosa em termos de custos de investimento e manutenção. As principais desvantagens são a dependência da qualidade da água do rio a montante e possíveis impactos no ambiente, no caso de falhas no tratamento da água [8].

A intensificação da produção aquícola tem, no entanto, dado origem a algumas reservas no que concerne à conservação dos recursos naturais envolventes. Devem ser usados modelos de gestão ambiental, devendo existir medidas de prevenção e/ou controlo da contaminação aquática. Estas medidas assumem uma maior importância quando os compostos disseminados podem provocar graves consequências na biodiversidade e na saúde humana [9].

1.2. Aquacultura e Alimentação Coletiva

O consumo de pescado nas refeições consumidas fora-de-casa tem vindo a aumentar. Por exemplo, na França e na região central norte dos EUA, o consumo de peixe é muito maior fora de casa comparando com as refeições feitas em casa [10].

O aumento do consumo de peixe tem sido gradual. Em França, por exemplo, o consumo de pescado aumentou consideravelmente, entre 1980 e 2000. Estudos efetuados relativos ao ano de 1998 permitiram concluir que 23% do pescado adquirido pelos restaurantes franceses nesse ano era proveniente de aquacultura (Figura 1.1)

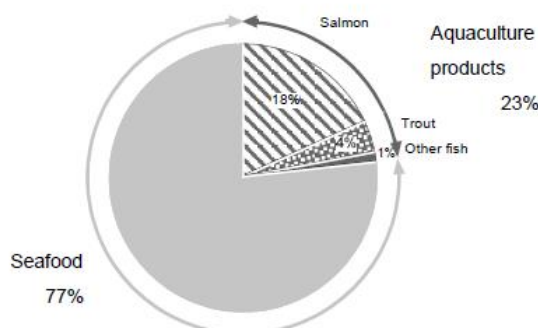


Figura 1. 1- Percentagem de pescado adquirido pelas unidades de restauração em França, no ano de 1998 [10].

Por um lado, os consumidores exigem cada vez mais rapidez e conveniência, mas também se preocupam com a qualidade dos alimentos que estão a ingerir. Os responsáveis pelas vendas da restauração procuram também exigir aos seus fornecedores produtos de qualidade, aumentando assim o padrão de qualidade dos mesmos [11]. Com o desenvolvimento do sector de aquacultura, é possível que, tanto os consumidores como as

unidades de alimentação coletiva tenham ao seu dispor alimentos de qualidade. Porém, os aquicultores enfrentam ainda algumas dificuldades relacionadas com os conflitos com o setor da pesca, falta de *feedback* dos seus clientes/consumidores relativamente às suas preferências e problemas burocráticos governamentais [12].

É importante que haja então uma relação de vantagem mútua entre o setor da alimentação coletiva e da produção aquícola, e para isso, algumas entidades oficiais têm contribuído para tal, dando a conhecer aos responsáveis das unidades de restauração as vantagens dos produtos resultantes da aquacultura, para acabar com algumas dúvidas e reticências que ainda possam haver. Em termos nutricionais, os produtos em questão, são saudáveis, possuem características nutricionais adaptáveis a todos os consumidores, são de fácil manipulação e de rápida confeção. É relativamente fácil controlar a sua temperatura, são bastante versáteis para a elaboração de ementas, facilitando a realização das mesmas pois a sua qualidade mantém-se constante, bem como o tamanho das porções [10]. Além disso, estes produtos estão disponíveis durante todo o ano, permitindo preços menores e mais estáveis, comparativamente aos produtos obtidos na pesca, ajudando significativamente na gestão dos orçamentos e no cálculo das capitações [10], [13].

1.3. Compostos usados em Aquacultura

Os meios de aquacultura são comumente propícios ao desenvolvimento rápido de doenças, o que leva ao uso de produtos veterinários e desinfetantes para controlo. Esse mesmo uso terá de ser controlado e feito de maneira correta de modo a minimizar o impacto ambiental e na saúde do Homem [9].

Existem diversos compostos químicos utilizados em aquacultura, entre os quais se encontram antibióticos, parasitocidas, fertilizantes, anestésicos, oxidantes algicidas/herbicidas e hormonas. Os seus riscos dependem principalmente do grupo a que pertencem e da forma/dose com que o composto em causa é inserido no sistema. De um modo geral, os antibióticos são os compostos que têm causado uma maior preocupação ao nível da saúde pública [9].

Antibióticos em Aquacultura

Os antibióticos são compostos utilizados comumente em aquacultura, para o controlo de doenças infecciosas bacterianas, ou para eliminar bactérias patogénicas nos animais, prevenindo o aparecimento dessas doenças [14].

É frequente o uso de antimicrobianos também para promover o crescimento dos animais em cativeiro. Embora, a utilização com esta finalidade esteja limitada, ou proibida em alguns países, não existe legislação específica que estabeleça limites para a descarga de antibióticos no meio ambiente [15].

Segurança Alimentar e Resistência aos Antibióticos

Com o rápido crescimento e intensificação da aquacultura a nível mundial, surge também a preocupação no que diz respeito à segurança alimentar dos produtos daí provenientes e dos possíveis riscos para a saúde pública. Na união europeia, já se estabeleceram limites e medidas de controlo, sendo o uso de antibióticos somente permitido para tratar doenças infecciosas nos peixes [15], [16].

Em alguns países, as políticas de vacinação têm-se mostrado eficazes, prevenindo o desenvolvimento de doenças nos animais, reduzindo assim o uso de antibióticos [14], [17]. Há, porém, regiões, nomeadamente na Ásia (maiores produtores mundiais de pescado), onde o uso de antibióticos não é controlado, mas sim intensificado (profilaxia e terapia empírica), levando a que os antibióticos se mantenham na água e em doses sub-inibitórias [17].

O uso de antibióticos em aquacultura é um tema preocupante, pois sabe-se que pode haver disseminação destes compostos pelo meio aquático, através das fezes dos peixes e através dos antibióticos existentes nas águas do seu cultivo. Quando administrados, através da ração ou por injeção direta dos compostos na água (terapia de imersão) [16], apenas uma percentagem é absorvida pelo peixe. Foi estimado que cerca de 60-73% de oxitetraciclina (do mesmo grupo do antibiótico em estudo) administrado às percas em aquacultura na Grécia, é libertado para o ambiente através das fezes do peixe [14].

O risco mais conhecido associado à indevida utilização de antibióticos é o aparecimento de estirpes microbianas resistentes a esses mesmos

antibióticos [9]. Alguns dos casos registados encontram-se listados na tabela 1.1.

Tabela1.1 Grupos de antibióticos associados ao aparecimento de estirpes microbianas resistentes e a sua relevância no contexto da clínica humana [18].

Classe dos compostos	Importância para a medicina humana	Exemplo	Bactérias resistentes
Aminoglicosídeos	Criticamente importante	Estreptomicina	Edwardsiella ictulari
Anfericois	Importante	Florfenicol	Enterobacter spp. e Pseudomonas spp.
Lactâmicos beta	Criticamente importante	Amoxilina	Vibrio spp., Aeromonas spp. e Edwardsiella tarda
Lactâmicos beta	Criticamente importante	Ampicilina	Vibrio harvey
Fluoroquinolonas	Criticamente importante	Enrofloxacin	Tenacibaculum maritimum
Macrólidos	Criticamente importante	Eritromicina	Salmonela spp.
Nitrofuranos	Criticamente importante	Furazolidona	Vibrio anguillarum
Nitrofuranos	Importante	Nitrofurantoína	Vibrio harvey
Quinolonas	Criticamente importante	Ácido oxilínico	Aeromonas spp., Pseudomonas spp e Vibrio spp.
Sulfanoamidas	Importante	Sulfadiazina	Aeromonas spp.
Tetraciclina	Altamente importante	Tetraciclina	Aeromonas hydrophila
Tetraciclina	Altamente importante	Oxitetraciclina	Aeromonas salmonicida

No que diz respeito à segurança alimentar, podem surgir questões relacionadas com o aumento da resistência bacteriana aos antibióticos, com a presença de resíduos de medicamentos veterinários nos produtos de origem aquícola e com os encargos financeiros elevados dos tratamentos, que têm vindo a prolongar-se e a agravar-se devido à redução da sua eficácia [15], [18].

Após a exposição bacteriana aos antibióticos, pode haver uma seleção e propagação de bactérias resistentes nos peixes, na água ou no sedimento dos tanques e no meio aquático que recebe as águas provenientes da aquacultura. Os organismos resistentes possuem a capacidade de sobreviver na presença de concentrações elevadas de antibióticos [14], [6].

Estas bactérias presentes no meio aquático podem apresentar um reservatório de genes de resistência, que podem ser transferidos para os humanos. O contacto do Homem com as bactérias resistentes pode dar-se através do consumo e/ou manipulação do pescado ou de atividades de lazer em sistemas aquáticos contaminados [14], [19]. Entre os vários grupos de

antibióticos associados a episódios de resistência microbiana encontram-se as tetraciclinas, cuja utilização no sector aquícola tem tido uma expressão significativa [9].

A propagação dos genes de resistência a antibióticos não se limita por barreiras filogenéticas, geográficas ou ecológicas, o que poderá representar uma ameaça para a saúde pública, através da transmissão direta de bactérias da água para o Homem, pela ingestão ou manipulação do pescado, ou indireta, em que a água é o intermediário de genes de resistência [14], [6].

Os processos de resistência aos antibióticos são provocados por mutações genéticas ou pela aquisição de genes de resistência, e podem ser transmitidos por via vertical ou horizontal [20]. Entende-se por transferência vertical de genes a transmissão de material genético da célula mãe para a célula filha, enquanto a transferência horizontal de genes é a troca de material genético entre bactérias independentes. Esta é considerada muito importante para a propagação de genes, pois possibilita a troca de informação entre bactérias de espécies diferentes através de elementos como os plasmídeos, por exemplo [21], [22].

Os genes idênticos presentes em isolados diferentes do mesmo habitat e nos isolados de animais e do Homem, representam um exemplo de transferência horizontal na propagação da resistência através da cadeia alimentar [23]. Alguns estudos detetaram plasmídeos idênticos, encerrando genes de resistência, que foram depois transferidos, *in vitro*, de bactérias presentes no meio aquático e no peixe (ex.: *Aeromonas hydrophila* e *Vibrio salmonicida*), para bactérias da mesma espécie e para *E. coli*. Os dados recolhidos sugerem que bactérias aquáticas, inclusive as patogénicas presentes no peixe, podem constituir reservatórios de genes de resistência a antibióticos podendo ser transferidos para patogénicos humanos [14].

Algumas bactérias, como as *Enterobacteriaceae*, são consideradas fundamentais neste processo, tendo em conta que são comuns à flora intestinal do Homem, e outros animais podem transferir os seus genes de resistência a antibióticos para outras bactérias da sua flora intestinal [23], [24].

Na atualidade, existe uma crescente preocupação com a disseminação da resistência aos antibióticos, pela cadeia alimentar, nomeadamente no que

diz respeito àqueles considerados pela Organização Mundial de Saúde (OMS), como clinicamente relevantes (*critically important*). Entre estes, estão as fluoroquinolonas e as cefalosporinas, antibióticos de largo espectro, utilizados na medicina humana e na produção animal, tendo-se verificado a sua resistência em algumas bactérias patogénicas [25].

A transmissão de bactérias resistentes aos antibióticos, através da cadeia alimentar, desde a produção primária até à cozinha/unidades de alimentação coletiva, pode fazer-se de várias formas:

- a) Incorreta evisceração do peixe, levando à contaminação da parte edível do mesmo;
- b) Contaminação cruzada entre os alimentos cozinhados e o pescado cru;
- c) Temperaturas inapropriadas de confeção do alimento, não permitindo a eliminação dos microrganismos, podendo conduzir à ingestão de bactérias resistentes a antibióticos pelos consumidores.

Desta forma, com o crescente consumo de pescado de aquacultura, aumenta-se a probabilidade de ingestão de bactérias, genes e resíduos de antibióticos, especialmente em alimentos termicamente pouco processados [14], [26], [27].

A ingestão destas bactérias pode trazer consequências nefastas para a saúde do Homem, como o aumento da severidade das infeções e das falhas terapêuticas, aumentando os tempos de tratamento e a sua complexidade, assim como as taxas de morbilidade e de mortalidade. Indivíduos que ingeriram resíduos de antimicrobianos têm maior probabilidade de sofrer alterações ao nível do trato intestinal, ficando mais suscetíveis a infeções por bactérias patogénicas, enquanto a comunidade microbiana não é reposta [14].

Os estudos acerca da utilização de antibióticos na aquacultura e as suas consequências para a saúde humana são ainda escassos, apesar das atuais evidências e da aquacultura representar, neste momento, em Portugal, uma das produções com maior expansão. Além disso, nos próprios pontos de venda, as análises efetuadas no pescado, são ainda escassas ou inexistentes. Estes estudos são de grande importância para a saúde pública, principalmente quando falamos em segurança alimentar, aspeto fundamental em unidades de

alimentação coletiva, que recorre cada vez mais frequentemente aos produtos provenientes da aquacultura [14].

Tetraciclina

A tetraciclina e os seus análogos, como a doxiciclina, a clortetraciclina e a oxitetraciclina, são antibióticos de largo espectro, frequentemente utilizados em medicina veterinária. A sua estrutura química está representada na Figura 1.2. De uma forma geral, as tetraciclina atuam por inibição da subunidade 30s do ribossoma procariótico, que se ligaria ao RNA de transferência durante a síntese proteica, uma condição crucial para a sobrevivência das células. Em aquacultura, as tetraciclina são utilizadas para tratamento e prevenção de doenças bacterianas de peixes e outros animais marinhos. Visto serem utilizadas de maneira intensa, a ocorrência de agentes patogénicos nos peixes resistentes a tetraciclina tem sido crescente. Por esse facto, as doses introduzidas no meio aquático devem ser controladas, para impedir a dispersão de estirpes resistentes [9].

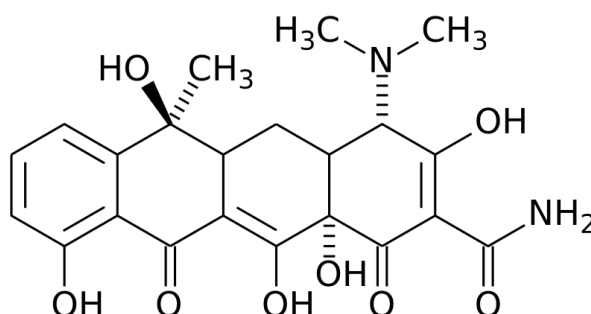


Figura 1. 2- Estrutura Química da Tetraciclina [9].

1.4. Métodos Analíticos para Tetraciclina

As técnicas analíticas para deteção de tetraciclina podem ser classificadas em quatro grupos: técnicas microbiológicas, separativas, eletroanalíticas e óticas. Seguidamente irá descrever-se, resumidamente, os diferentes métodos, para estabelecer uma comparação entre os pontos fortes e menos fortes destas técnicas.

Técnicas Microbiológicas

Estas técnicas requerem a utilização de espécies microbianas. Os meios de cultura para o isolamento de microrganismos, podem classificar-se como meios de cultura gerais e meios de cultura seletivos. Os gerais possibilitam o desenvolvimento da maior parte dos principais grupos de microrganismos, sendo importante referir que ainda não se dispõe um meio que permita a deteção de qualquer tipo de espécie microbiana com elevada eficiência. A composição do meio deverá ser a mais parecida possível com o “habitat” natural dos microrganismos em estudo. Quanto aos seletivos, estes permitem a proliferação de grupos bacterianos específicos, enquanto inibem o crescimento de outros. Esta seletividade é consequência da utilização de compostos inibidores, da escolha do pH apropriado ou da não utilização de nutrientes específicos [28].

Os métodos microbiológicos baseiam-se essencialmente na inibição de crescimento dos microrganismos estudados, havendo a mudança de cor de um indicador de pH no meio. A maior parte dos testes é composto por um meio de cultura com um indicador de pH e um número padrão de esporos de *Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*. Esta bactéria é utilizada no kit pois é muito sensível a vários antibióticos. Às temperaturas de 64-65 °C, há a germinação e multiplicação dos esporos, ocorrendo a formação de ácido. Quando há a formação de uma quantidade de ácido suficiente, a cor do indicador de pH muda de violeta para amarelo. Contudo, se a amostra contiver um antibiótico (substância inibidora), em concentração suficiente, causa inibição do processo de multiplicação celular, não havendo formação do ácido. A cor do meio mantém-se violeta. Se a concentração do antibiótico estiver acima do limite de deteção do teste, o meio não muda de cor, mantendo-se violeta. Se a concentração do antibiótico estiver próxima do limite de deteção, a cor do meio muda, ficando entre violeta e amarelo. Este tipo de kits é de fácil utilização, porém pode haver dificuldades na interpretação dos resultados, pois as leituras visuais do meio podem ser subjetivas [29].

A resposta biológica neste tipo de testes, pode variar, sendo necessários também extensos períodos de tempo para o crescimento celular. Para além disso, os métodos microbiológicos necessitam, por vezes, de análises

laboratoriais mais rigorosas, para confirmação de resultados [9]. Os métodos utilizados nessas análises mais rigorosas envolvem métodos de HPLC/MS e tornando-se, por isso, demasiado caros para modo de verificação dos resultados de análises microbiológicas.

Técnicas Separativas

As técnicas separativas consistem na separação instrumental dos componentes de uma amostra. Entre os métodos separativos mais conhecidos, está a cromatografia. É difícil definir com rigor o que se entende por cromatografia, devido à grande variedade de sistemas e técnicas que têm sido aplicadas. Porém, todos os métodos compreendem uma fase estacionária e uma fase móvel. Resumidamente, a amostra é transportada pela fase móvel, quer seja um líquido, gás etc., forçada pela fase estacionária imiscível fixa, colocada na coluna ou numa superfície sólida. Os componentes da amostra distribuem-se entre as fases. Os componentes que não se ligam facilmente à fase estacionária movem-se mais rapidamente e chegam primeiro ao detetor. Para a deteção das tetraciclinas, são descritos na literatura sistemas cromatográficos, baseados em cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), agregados a outros métodos [16], [30].

O equipamento envolvido nesta análise envolve custos de aquisição e manutenção elevados e a obtenção de resultados analíticos bons requer uma remoção de interferências e/ou concentração do analito previamente otimizado por um processo de extração/purificação de compostos aumentando assim o tempo de análise. Além disso a monitorização da amostra em tempo real não é possível realizar e a recuperação total do analito poderá não ser possível.

Técnicas Eletroanalíticas

São estes métodos que transmitem informação química sobre a solução em estudo, através da medida de uma propriedade de origem elétrica numa célula eletroquímica. Quanto às suas vantagens, entre elas está o facto de se poder obter rapidamente informação quantitativa, para concentrações vestigiais de analito. Além disso, o equipamento utilizado é de baixo custo e de fácil monitorização e transporte, o que é útil para trabalho de campo. Para a

preparação das amostras, os processos são pouco sofisticados e não prejudicam o ambiente. Para a detecção das tetraciclinas, são utilizados vários métodos eletroanalíticos, baseados em medidas potenciométricas com eletrodos seletivos. Estas medidas são rápidas e seletivas, mas por vezes não é fácil utilizar em análises de campo (na ausência de potenciômetros portáteis) [31-34].

Técnicas Óticas

Quando se fala de métodos óticos, é importante referir a espectrofotometria de UV/Vis, sendo um método ótico muito utilizado nos laboratórios analíticos e na determinação de tetraciclinas. Este consiste na absorção de radiação na gama ultravioleta e visível, medida por um espectrofotómetro, equipamento de baixo custo, que fornece informação de natureza quantitativa. A capacidade de detecção é, no entanto, limitada para níveis vestigiais de compostos orgânicos, dificultando a sua aplicação para a detecção de tetraciclinas [35].

A maioria dos métodos óticos não possuem as características necessárias para serem aplicados no local pelos produtores que necessitam de dispositivos de baixo custo e procedimento simples, com respostas rápidas e sensíveis.

Dentro dos métodos óticos, é possível também encontrar superfícies sólidas modificadas, que permitem identificar/quantificar antibióticos por contacto direto com a solução de medida e geração de cor. Entre estes trabalhos incluem-se três tiras de detecção de cor para a detecção de antibióticos no ambiente aquático, dedicados às quinolonas [36],[37] e tetraciclina [9]. As tiras para detecção de quinolonas são constituídas por PVC plastificado onde é aprisionado um reagente apropriado, com a qual o antibiótico iria formar um complexo corado. A reação colorimétrica ocorreu na interface de sólido/líquido estabelecida entre a camada de PVC plastificado (contendo o reagente) e a solução de amostra (antibiótico). A tira de detecção de tetraciclina propõe a utilização de papel de celulose como elemento de apoio quimicamente modificado por uma abordagem de auto - montagem para se ligar a um reagente que sensibiliza este material para a presença do antibiótico. Este

último trabalho vem tentar solucionar a questão económica inerente à construção destes sensores, apresentando-se por isso economicamente mais viável que o de PVC, uma vez que os custos de produção dos mesmos são mais reduzidos [37].

De uma forma geral, os trabalhos em suporte sólido são muito interessantes do ponto de vista da sua aplicabilidade local. A sua aplicação qualitativa é intuitiva porque depende da cor formada. A sua aplicação quantitativa pode recorrer a várias estratégias de manipulação da cor, sendo a mais simples a recolha da fotografia em formato digital e o tratamento matemático das coordenadas de cor adquiridas em programas simples do Office/Windows. Descrevem-se de seguida alguns aspetos simples relativos a modelos de cor e necessários à aplicação prática descrita posteriormente.

1.5. Modelos de cores

Um espaço de cor é um modelo matemático que descreve cada cor a partir de fórmulas. Deste tratamento resulta uma representação geométrica, tridimensional, onde as cores podem ser observadas usando um modelo de cor [37]. Como exemplo de modelos de cores temos, o RGB (Red, Green e Blue), representado na Figura 1.3, o CMYK (Cyan, Magenta, Yellow e Preto; K de Key do inglês=chave), o HSB (hue, saturation, brightness, ou então, tonalidade, saturação e brilho), o HSL (hue, saturation, and lightness, ou então, tonalidade, saturação e luminosidade) ou o CIE-Lab.

As coordenadas que tipificam os modelos de cor são, na maioria dos casos, comuns. Por exemplo, no modelo HSB, o brilho (semelhante a luminosidade) define-se pela quantidade de luz e pode ser detetado por variações na sua intensidade [37]. A saturação diz respeito à intensidade e está relacionada com a pureza/opacidade da cor. A tonalidade representa a cor, como o vermelho, o verde ou o azul. A combinação das três coordenadas permite criar um espaço de cor, onde cada cor pode ser identificada pelos valores dessas coordenadas.

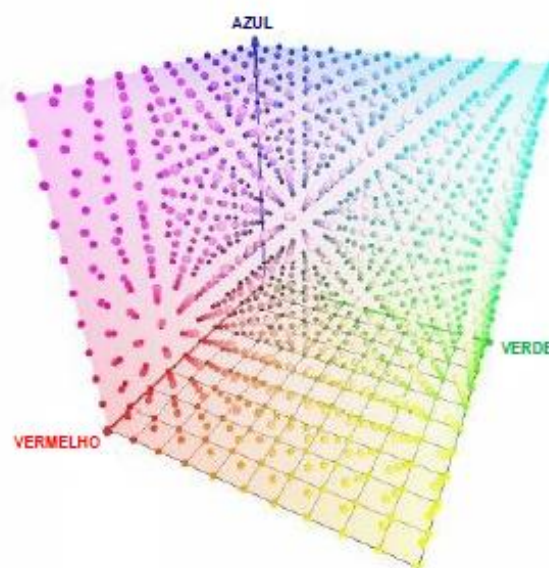


Figura 1.3- Modelo RGB [38].

Para criar modelos de cores com espaço de cor independente do dispositivo, foram gerados modelos como o HSL. Este modelo, em paralelo com o RGB, define as cores nos programas gráficos de computadores para que combinem com a percepção das cores da visão humana, definindo a cor pelos três eixos indicados na Figura 1.4 [9].

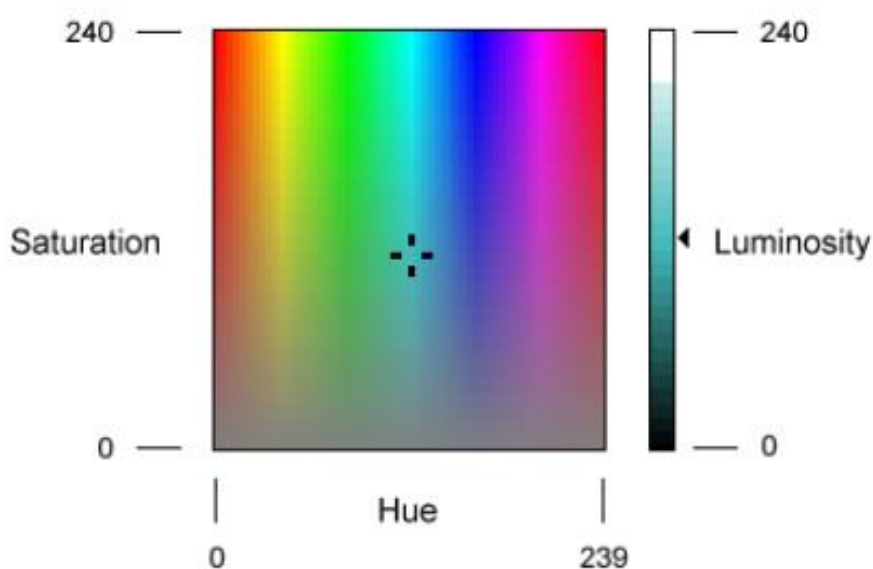


Figura 1. 4 -Tonalidade, Luminosidade e Saturação [39].

Para tratamento de imagens, baseado no modelo HSL, pode usar-se o programa *Paint*, disponibilizado pela Microsoft. Na caixa de diálogo existem controlos para especificar os valores HSL. Na Figura 1.4 é possível observar as escalas de valores que o operador de imagem pode especificar com esses controlos. Na caixa de diálogo de cor, a escala para os valores de saturação e de luminosidade varia entre 0 e 240 e no caso da tonalidade o intervalo vai desde 0 a 239.

1.6. Considerações Gerais

De uma maneira geral, deve existir um controlo mais rigoroso da dose de antibiótico administrada em sistemas de aquacultura. Os métodos existentes e descritos na literatura exigem análises em laboratório mais complexas, dispendiosas e não possibilitam a sua aplicação no local.

De uma forma geral, considerando os trabalhos anteriormente descritos, em particular os materiais sensores anteriormente desenvolvidos na BioMark-CINTESIS/ISEP, que recorreram a suporte de PVC e papel [9], há ainda lugar para o desenvolvimento de um método rápido e de fácil interação com a amostra e leitura analítica. Neste método seria interessante recorrer às típicas zaragatoas, vulgarmente reconhecidas em séries policiais para a colheita de ADN.

Neste sentido, neste trabalho poder-se-ia modificar um método simples, rápido, de baixo impacto ambiental e capaz de ser facilmente transportado, para a monitorização de tetraciclinas em aquacultura, optou-se por recorrer ao material celulósico patente nas zaragatoas, uma vez que estas permitem a implementação de um procedimento analítico local simples. O material celulósico em causa é o Rayon, cuja estrutura geral se representa na Figura 1.5.

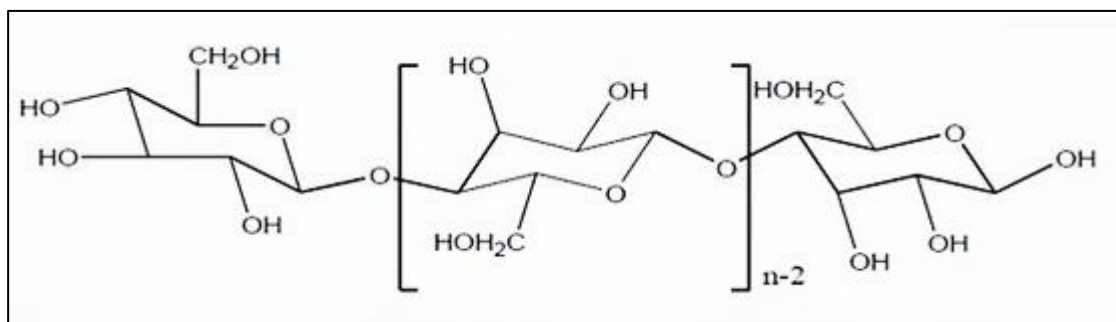


Figura 1.5- Fibras de Rayon.

Este material é ainda barato e o procedimento analítico inerente simples, idêntico ao método utilizado na monitorização do pH, no qual se usa uma tira de papel universal para leitura do mesmo. Neste caso, a zaragatoa é mergulhada na amostra e a intensidade da coloração gerada varia conforme a concentração de antibiótico presente. Para prova de conceito desta proposta, escolheu-se como antibiótico alvo a Clortetraciclina (CTC).

2. Descrição Experimental

2.1. Material, Equipamentos e Reagentes

Os balões volumétricos utilizados tinham capacidade compreendida entre 25 mL e 100 mL e eram de classe A. A medição dos volumes foi feita com micropipetas de volume regulável da marca VWR *Signature EHP pipettor*. Os tubos (Deltalab) para a centrifugação tinham capacidade de 15 mL.

Para a pesagem dos reagentes sólidos, utilizaram-se as balanças analíticas Radwag XA 110/X e Mettler Toledo MS105DU, com uma precisão de $\pm 0,0001$ g. De forma a facilitar a dissolução dos sólidos, estes foram colocados no banho de ultra-sons Selecta Ultrasons H-D. Para a detecção de grupos funcionais em materiais sólidos recorreu-se ao espectrómetro de Infravermelho com transformada de Fourier (do inglês, *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*, FTIR) acoplado a um acessório de refletância total atenuada (do inglês, *Attenuated Total Reflectance*, ATR) da Thermo Scientific Nicolet iS10. As diferentes temperaturas de incubação foram testadas com a placa de calor IKA RCT basic. A centrífuga utilizada era a Eppendorf centrifuge 5810R.

A água utilizada durante os ensaios tem condutividade $< 0,1$ $\mu\text{S}/\text{cm}$ à temperatura ambiente. Quanto aos reagentes utilizados, estes foram os seguintes: cisteamina (Merck), CTC (Sigma Aldrich), 3-aminopropil-trietoxissilano 99% (APTES, Sigma Aldrich), ácido clorídrico (HCl, Panreac), ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]etanosulfónico (HEPES, Sigma Aldrich), sulfato de cobre (II) pentahidratado (Panreac), cloreto de ferro hexahidratado (Scharlau), nitrato de prata (Merck), cloreto de zinco (Merck), cloreto de cálcio dihidratado (Merck), Legofer, permanganato de potássio (BDH), dicromato de potássio (Merck), sulfato de alumínio hexadecahidratado (BDH), nitrato de chumbo (Riedel-de-Haen), ácido sulfúrico 95-97% (Sigma Aldrich), hidróxido de sódio (Scharlau), acetonitrilo (Carlo Erba), amoxicilina (Fluka), norfloxacin (Fluka), cloranfenicol (Fluka) e etanol puro $\geq 99.9\%$ (Carlo Erba). As zaragatoas utilizadas eram FL Medical. As cores observadas nas zaragatoas foram registadas em câmara digital Huawei, 13MP.

2.2. Formação de complexos em solução aquosa

Na primeira fase do trabalho prático fizeram-se testes de identificação das espécies metálicas capazes de formar complexos corados com a CTC em diferentes meios (estudo do efeito da composição e o pH do meio). Para tal, misturaram-se 2,0 mL de CTC $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L com 1,0 mL da solução aquosa que continha a espécie metálica (concentração: $1,0 \times 10^{-2}$ mol/L). Os meios testados foram água ultra-pura, HCl $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L e HEPES $1,0 \times 10^{-2}$ mol/L.

2.3. Modificação do Rayon

Foram testados dois procedimentos para a modificação do Rayon:

- i. APTES, em solução a 10%, diluída em etanol;
- ii. Cisteamina 0,4 mol/L, em solução preparada com etanol 96%.

Os iões selecionados no ponto 2.2 foram colocados em contacto com as soluções de CTC, procedendo-se à monitorização da cor originada. Às zaragatoas modificadas com os metais atribuíram-se letras (para identificar a espécie metálica) e números (para identificar o número de ensaio).

O tempo de reação para esta modificação foi de 3h e foi escolhido após consulta de outros trabalhos presentes na literatura [10], [43]. A esquematização deste procedimento experimental pode ser consultada na tabela A.1 no anexo A. Todos os resultados foram comparados visualmente e registados em imagem digital.

2.4. Análise de espectros pelo FTIR

Os espectros de infravermelho foram recolhidos após a correção de fundo e sob o controlo de temperatura ambiente/humidade. Foram analisadas amostras de Rayon comercial e de Rayon modificado quimicamente. Os espectros foram representados com número de onda no eixo xx (variável entre 500 a 4000 cm^{-1}) e transmitância no eixo yy (%). O número de espectros recolhidos foi, no mínimo 20.

Todos os resultados foram comparados visualmente e registados em imagem digital.

2.5. Otimização do sensor modificado por APTES (10%) em etanol

O processo foi otimizado através do estudo do efeito das concentrações de APTES, da espécie metálica e do tempo de reação entre o Rayon e o APTES. O procedimento experimental seguiu o alinhamento da tabela A.1, presente no anexo A. Todos os resultados foram comparados visualmente e registados em imagem digital.

Concentração de APTES

O Rayon modificado foi preparado com APTES preparado em etanol nas concentrações: 5%, 10%, 50% e 100%. As concentrações de antibiótico utilizadas foram $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L e $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L.

Pré-tratamento do Rayon

Por forma a homogeneizar a superfície do material, testou-se um pré-tratamento do mesmo com diferentes reagentes:

- i. H_2SO_4 (0,5 mol/L),
- ii. NaOH (0,25 mol/L),
- iii. etanol puro;
- iv. acetonitrilo puro.

Este processo antecede a modificação com o APTES e o pré-tratamento selecionado foi aquele que visou uma melhor homogeneidade de cor visualmente observada no rayon.

Tempo de reação da imobilização da espécie metálica

Após o pré-tratamento do material sensor e a modificação com o APTES, testou-se o tempo de contacto com a espécie metálica. Os tempos testados foram: 30 minutos, 1 hora e 2 horas. A esquematização deste procedimento experimental pode ser consultada na Tabela A.2 no anexo A.

Temperatura de reação da imobilização da espécie metálica

Nesta fase, após o pré-tratamento e modificação do Rayon, as zaragatoas foram mergulhadas em soluções de espécie metálica, durante 30 minutos, a 40, 50 e 60°C, sobre ação de uma placa de calor. O material foi

depois colocado em contacto com o antibiótico, em solução de concentração $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L.

Concentração de espécie metálica imobilizada

Para testar a concentração da espécie metálica, utilizaram-se as concentrações: $1,0 \times 10^{-1}$, $1,0 \times 10^{-2}$ e $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L. O tempo de contacto entre o Rayon modificado com APTES e a solução do metal foi de 30 minutos, à temperatura seleccionada. A solução de CTC utilizada apresentava um valor de concentração igual a $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L.

Tempo de reação de APTES

O tempo de reação entre o Rayon e o APTES foi testado para 1, 3 e 6 horas. As condições utilizadas neste estudo, relativamente à concentração de espécie metálica, à temperatura de reação e ao tempo de reação com a espécie metálica, foram as seleccionadas nos pontos anteriores. A concentração de CTC testada foi igual a $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L.

2.6. Seletividade em relação a outros antibióticos

A resposta do material sensor modificado foi testada face a diferentes antibióticos que são utilizados em sistemas de aquacultura e que representam nomenclaturas e aplicabilidades diferentes nestes sistemas. Foram testados os seguintes antibióticos: Cloranfenicol, Amoxicilina e Norfloxacin. O sensor de Rayon foi mergulhado em soluções de antibiótico com concentração igual a $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L. Nesta fase não foi utilizada a CTC.

2.7. Aplicação do sensor numa amostra de água de aquário

Nesta fase do estudo, o objetivo foi testar a resposta do sensor em contexto real ou próximo do real. Para tal, o sensor otimizado no ponto 2.5 foi testado numa amostra de água retirada do aquário doméstico existente no laboratório, a qual foi dopada com duas concentrações de CTC diferentes: $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L e $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L de CTC. O sensor foi mergulhado diretamente nestas amostras dopadas.

2.8. Aplicação do sensor numa amostra de peixe e de frango

Nesta análise, foram utilizadas para a recolha das amostras, uma truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) proveniente de aquacultura e uma amostra de frango de aviário.

Para testar o sensor em alimentos sólidos foi necessário um tratamento prévio da amostra, de modo a proceder à sua diluição. Para tal, recorreu-se a um procedimento experimental descrito na literatura [40]. Fez-se então a moagem de cerca de 2 mg de amostra, que foram posteriormente colocadas em solução com água desionizada (10mL). Após forte agitação, as amostras foram sujeitas a ultrassons durante 5 minutos, seguindo-se a centrifugação por 5 minutos a 1000 rpm. Após diluição completa do alimento, o sensor foi mergulhado numa amostra de peixe/frango dopada com CTC, na concentração ($1,0 \times 10^{-3}$ mol/L).

3. Resultados e Discussão

O desenvolvimento de um sensor de Rayon para a detecção de CTC em água e alimentos baseou-se na reação entre uma espécie metálica imobilizada no derivado celulósico e o antibiótico, com subsequente formação de cor. Assim, os primeiros estudos visaram identificar as espécies metálicas capazes de gerar cores intensas na sequência da presença de CTC, e depois a sua fixação num novo suporte, o Rayon.

3.1. Seleção das Espécies Metálicas

Para a escolha das espécies metálicas passíveis de formar espécies coradas com a CTC, optou-se inicialmente por efetuar uma pesquisa na literatura. Desta pesquisa, apenas se identificou uma possível reação com Fe (III) [10]. Tendo em vista encontrar outras espécies alternativas, optou-se por complementar o estudo com outras espécies prontamente disponíveis no laboratório.

É importante ainda realçar que este estudo foi realizado em meio líquido, uma vez que neste estado físico a reação se torna mais intensa e óbvia. Em meio líquido há liberdade de movimento das moléculas, o que origina um aumento de probabilidade destas se encontrarem e de desencadearem a reação esperada.

As espécies metálicas testadas foram ferro (Fe^{3+}), cobre (Cu^{2+}), prata (Ag^+), zinco (Zn^{2+}), cálcio (Ca^{2+}), permanganato de potássio (MnO_4^-), sulfato de alumínio (Al^{3+}), dicromato de potássio ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$) e nitrato de chumbo (Pb^{2+}). Considerando a possível implicação do pH na solubilização da espécie metálica e na formação da espécie corada, preparam-se as soluções em diferentes meios: (i) água ultrapura, (ii) HCl $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L e (iii) HEPES $1,0 \times 10^{-2}$ mol/L. A concentração de CTC utilizada neste ensaio foi igual a $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L e os resultados obtidos podem ser consultados na Tabela 3.1. De um modo geral, apenas os iões Cu^{2+} , Fe^{3+} , Ag^+ , MnO_4^- e Al^{3+} formaram produtos corados nos meios estudados, quando na presença da CTC.

Tabela 3.1 - Cores das soluções das espécies metálicas, antes e depois da adição de CTC.

Iões	Solvente			Reações de complexação		
	H ₂ O	HCl	HEPES	H ₂ O	HCl	HEPES
Cu²⁺	Azul claro	Azul claro	Azul claro	Verde	Verde	Verde
Fe³⁺/Legofer	Laranja	Incolor	Laranja	Castanho	Castanho	Castanho
Ag⁺	Incolor	Cinzeno	Incolor	Castanho	Castanho	Castanho
Zn²⁺	Incolor	Incolor	Incolor	Incolor	Incolor	Incolor
Ca²⁺	Incolor	Incolor	Incolor	Incolor	Incolor	Incolor
MnO₄⁻	Roxo	Roxo	Precipitou	Negro	Negro	Precipitou
Cr₂O₇²⁻	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo claro	Amarelo claro	Amarelo claro
Al³⁺	Incolor	Incolor	Incolor	Amarelo claro	Amarelo claro	Amarelo claro
Pb²⁺	Incolor	Incolor	Incolor	Incolor	Incolor	Incolor

O catião Fe³⁺ apresentou cor amarela quando preparado em água ou solução HEPES, assinalando a possível presença de vestígios de óxido de ferro (III), uma espécie altamente insolúvel e que pode estar presente em quantidades vestigiais em soluções de pH superior a cerca de 4. Quando se adicionou antibiótico à solução de Fe³⁺, houve a formação de um produto de cor castanha, com intensidade semelhante em todos os meios estudados.

O catião Ag⁺ apresentou-se sem cor em água e em HEPES, mas formou uma suspensão de cor acinzentada quando em HCl; esta cor relacionou-se com a formação de cloreto de prata, um sal de prata altamente insolúvel. Quando as soluções de Ag⁺ foram misturadas com a CTC, observou-se a formação de uma cor acastanhada, cuja intensidade foi superior em água.

O catião Cu²⁺ presente em meio líquido conferiu uma tonalidade azul ao meio, característica desta espécie em solução aquosa. Uma vez misturada com antibiótico, a solução do metal adquiriu um tom esverdeado, revelando assim a

ocorrência de reação entre o cobre (II) e a CTC. Considerando que a espécie Cu(I) apresenta um tom esverdeado, é possível que a reação em causa seja uma reação de oxidação/redução, com redução do Cu^{2+} a Cu^+ .

O anião MnO_4^- apresentou-se em solução com uma coloração violeta, típica, bastante intensa, em todos os meios exceto HEPES. Neste meio, o permanganato deu origem a um precipitado de cor castanha, possivelmente dióxido de manganês; foi ainda evidente que a espécie baseada em manganês deixou de existir livre em solução, uma vez que o sobrenadante se apresentava incolor. Na presença do antibiótico, a solução de permanganato adquiriu uma cor castanha, quando o meio foi água e HCl, dando origem à formação de um precipitado após cerca de 60 minutos. Em meio HEPES não houve evidência de qualquer reação, possivelmente porque a espécie permanganato já tinha reagido anteriormente, aquando da adição de HEPES.

Apesar das soluções de catião Al^{3+} não apresentarem qualquer cor, independentemente do meio, a adição de CTC deu origem ao aparecimento de uma cor amarela, reveladora da ocorrência de reação entre a espécie metálica e o antibiótico. A reação em causa foi possivelmente uma reação de complexação, uma vez que o alumínio só se apresenta na natureza com o número de oxidação +3. A cor amarela observada era diferente da cor original do antibiótico em solução aquosa, mas pouco intensa.

As restantes espécies metálicas em estudo, não produziram qualquer cor ou variação de cor relevante quando na presença de CTC, demonstrando assim a sua inadequação para a ocorrência de reação e subsequente formação de espécie corada, aquando da junção do antibiótico à espécie metálica.

Considerando os dados apresentados, apenas as espécies Fe^{3+} , Ag^+ , Cu^{2+} , MnO_4^- e Al^{3+} poderiam levar à produção de um material sensor para a CTC com deteção visual. Todavia, a solução de MnO_4^- com CTC apresentou-se pouco uniforme, dando mesmo origem à formação de precipitado em HEPES, prevendo-se assim a ocorrência de superfícies heterogêneas num suporte sólido, como o Rayon. Por sua vez, o Al^{3+} deu origem a cores pouco intensas, estimando-se a existência de leituras pouco sensíveis. Relativamente à utilização de Ag^+ , considerou-se que esta é uma espécie viável para a preparação de material sensor, mas cara quando comparada com o Fe^{3+} e o

Cu^{2+} , que constituem também alternativas baratas e viáveis. Assim, os ensaios seguintes prosseguiram com a utilização do Fe^{3+} e do Cu^{2+} , sob a forma de cloreto de ferro (III) e de sulfato de cobre (II).

Relativamente ao reagente utilizado para disponibilização em solução da espécie de Fe^{3+} , e considerando estudos realizados anteriormente com esta espécie [41], optou-se pela utilização de um produto farmacêutico comercial, denominado *Legofer*, que contém ferro trivalente sob a forma de proteinossuccinilato. A bula farmacêutica deste produto refere a sua utilização em casos de anemia, pois é capaz de transportar o ferro aos glóbulos vermelhos do sangue. A sua utilização no contexto deste trabalho decorre da presença de um derivado de Fe^{3+} de grande tamanho molecular e que pode contribuir para intensificar e estabilizar a ligação do ferro trivalente ao material celulósico de Rayon.

Relativamente aos meios utilizados na preparação das soluções, e considerando que as diferentes condições não influenciaram significativamente a cor observada, os estudos seguintes foram realizados apenas com soluções preparadas em água ultrapura. Além das vantagens económicas e ambientais decorrentes deste procedimento, a preparação em água oferecia ainda a possibilidade de eliminar etapas de pré-tratamento de amostra, já que as águas ambientais poderiam entrar em contacto diretamente com o sensor.

3.2. Modificação química do Rayon

Tendo em vista o desenvolvimento de um processo de deteção de CTC numa superfície sólida, como o Rayon, foi fundamental identificar uma estratégia eficaz de imobilização das espécies metálicas selecionadas, Fe^{3+} e Cu^{2+} . Esta imobilização visaria garantir uma ligação estável da espécie metálica à fibra Rayon, mesmo quando mergulhada em meio líquido.

Além disso, e na sequência de trabalhos anteriores, era já conhecido que espécies metálicas baseadas em cobre ou em ferro estabelecem complexos estáveis com grupos amina, $-\text{NH}_2$ [10]. Neste sentido, identificou-se a necessidade de transformar a superfície externa do Rayon, tipicamente com grupos baseados em enxofre e hidroxilo, numa superfície constituída por

grupos amina (e aos quais as espécies metálicas se poderiam ligar estavelmente).

Neste sentido, optou-se por identificar reações que permitissem converter a superfície externa do Rayon em grupos amina através de ligações covalentes à fibra. Considerando a estrutura geral do Rayon, representada na Figura 3.1, foram estudados dois reagentes alternativos: APTES e Cisteamina. O reagente APTES apresentava na sua estrutura um grupo silano, passível de ligação direta a grupos hidroxilo ($-OH$) vicinais (inerentes à existência de glucose no Rayon) e a cisteamina apresentava uma ligação tiol que, em condições adequadas poderia, talvez, estabelecer pontes dissulfureto com os átomos de enxofre do Rayon.

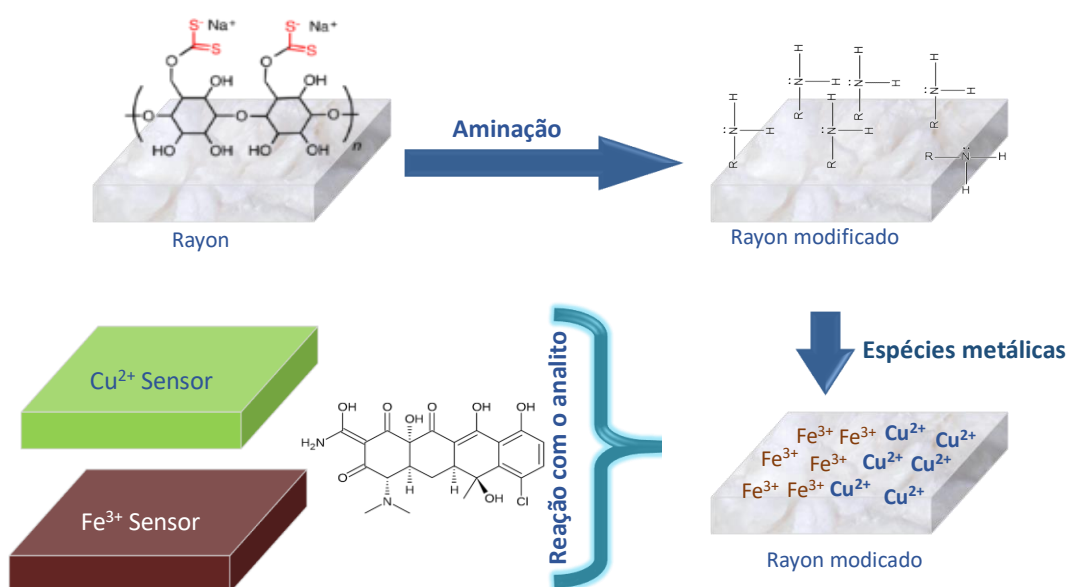


Figura 3.1- Processo de modificação do Rayon.

O efeito das duas reações alternativas foi testado por incubação do Rayon das zaragatoas em duas concentrações diferentes de CTC. Os resultados aqui obtidos foram registados digitalmente e podem ser observados nas tabelas 3.2 e 3.3.

Tabela 3.2 - Cores dos sensores obtidas após modificação do Rayon com APTES e posterior incubação em duas concentrações de CTC.





















CTC (mol/L)	Cores do sensor APTES			
	APTES	APTES/Cu ²⁺	APTES/Fe ³⁺	APTES/Legofer
—				
1,0×10 ⁻³	—			
1,0×10 ⁻⁴	—			

Tabela 3.3- Cores dos sensores obtidas após modificação do Rayon com Cisteamina e posterior incubação em duas concentrações de CTC.

CTC (mol/L)	Cores do sensor baseado em Cisteamina			
	Cisteamina	Cisteamina/Cu ²⁺	Cisteamina/Fe ³⁺	Cisteamina/Legofer
—				
1,0×10 ⁻³	—			
1,0×10 ⁻⁴	—			

Por análise dos resultados patentes nas tabelas, verificou-se que as reações mais eficazes de conversão do Rayon numa superfície aminada foram

as que envolveram o reagente APTES. Por um lado, o Rayon modificado com APTES apresentava uma coloração azul ligeira e adquiriu uma coloração intensa relativa às espécies metálicas presentes, após incubação nas soluções correspondentes. Por outro lado, observou-se ainda uma diferença na intensidade de coloração de zaragatoas incubadas em concentrações de CTC diferentes, o que antecipou uma elevada sensibilidade para o sistema corado em estudo. Pelo contrário, as reações com Cisteamina deram origem a variações de cor muito ténues, em todos os ensaios realizados.

Relativamente à espécie metálica propriamente dita, e independentemente da reação utilizada na formação da monocamada aminada, constatou-se que a espécie que originou variações mais sensíveis de cor foi o cobre. Esta sensibilidade registou-se na variação de coloração observada entre o Rayon de controlo e o Rayon modificado com grupos amina, especialmente para materiais modificados com APTES. A sensibilidade ficou também patente na variação da cor observada entre concentrações diferentes de CTC. Quando incubados na concentração de CTC mais elevada de antibiótico, os materiais sensores de APTES/Cu²⁺ mudaram a sua cor, variando de azul para amarelo esverdeado; os materiais sensores de APTES/Fe²⁺ alteraram de alaranjado para castanho, mantendo-se dentro do mesmo tom de cor; e os materiais sensores de APTES/*Legofe* sofreram apenas alterações suaves, dentro de tons alaranjados.

De um modo geral, o material sensor que mais se adequou aos objetivos deste trabalho foi o Rayon/APTES/Cu²⁺. A comparação das cores observadas indicou que as alterações de cor foram mais evidentes e intensas para este material, fazendo com que este seja o material sensor mais apropriado para dar continuidade aos ensaios seguintes. Apesar das variações no material Rayon/APTES/Fe³⁺ não serem tão evidentes, este material foi também alvo de estudo nos ensaios posteriores, uma vez que a variação de cor observada poderia ser intensificada face a procedimentos de otimização adequados.

3.3. Otimização do sensor













As fases seguintes do trabalho consistiram na otimização do material sensor, com o objetivo de aumentar a intensidade de variação de cor entre

concentrações próximas de CTC e assegurar a homogeneidade da cor observada na matriz do Rayon modificado. O material sensor foi alvo de otimização no que diz respeito a (a) concentração de APTES, (b) pré-tratamento do Rayon, (c) tempo de reação, (d) temperatura, (e) concentração da espécie metálica e (f) tempo de reação do APTES. Os resultados obtidos apresentam-se de seguida, tendo-se registado as imagens por fotografia digital e analisado os dados por comparação visual.

(a) Concentração de APTES

Para avaliar o efeito da concentração de APTES na preparação do sensor, utilizaram-se as concentrações de 5, 10, 50 e 100 %. Cada um destes sensores foi incubado em soluções de duas concentrações de antibiótico distintas. Os resultados obtidos encontram-se indicados nas tabelas 3.4 e 3.5.













Tabela 3.4 - Cores observadas para o material sensor APTES/Cu²⁺, preparado com diferentes concentrações de APTES.

CTC (mol/L)	APTES (%)			
	5	10	50	100
—				
1,0×10 ⁻³				
1,0×10 ⁻⁴				

Como se pode observar, a espécie Cu²⁺ parece ligar-se mais eficazmente à superfície do material APTES/Cu²⁺ quando se aumentou a concentração de APTES de 5 até 50 %. Esta evidência resultou do aumento da intensidade da cor azul observada, reveladora da presença de cobre. Esta coloração azul foi mais intensa na variação de 5 para 10 % em APTES, do que

na variação de 10 para 50 %, provavelmente devido à saturação da reação na superfície do Rayon. Para a concentração de APTES igual a 100 %, a reação de recobrimento do Rayon com grupos amina pareceu não ocorrer, uma vez que o material manteve a sua cor original (ou variou muito pouco). Esta evidência resultou possivelmente da ausência de água no meio, que atuaria também como catalisador da reação. Os resultados obtidos indicaram ainda que a variação de concentração de APTES não alterou a intensidade de variação da cor com a concentração de CTC, excetuando-se aqui os ensaios com 100 % de APTES.

Tabela 3.5 - Cores observadas para o material sensor APTES/Fe³⁺, preparado com diferentes concentrações de APTES.

CTC (mol/L)	APTES (%)			
	5	10	50	100
—				
1,0×10 ⁻³				
1,0×10 ⁻⁴				

No que diz respeito aos ensaios com os sensores APTES/Fe³⁺, a coloração indicativa da presença de Fe³⁺ aumentou com a variação de 5 para 10 % em APTES. Já os restantes ensaios, com 50 e 100% em APTES não foram consistentes, uma vez que a coloração do sensor não variou de modo previsível. Por outro lado, a incubação do Rayon em CTC deu origem a variações de castanho para laranja, sendo esta variação mais intensa para materiais modificados com 10 % de APTES.

Face ao exposto, os ensaios posteriores foram realizados apenas com o material sensor APTES/Cu²⁺, modificado com uma solução de APTES a 10 %,







uma vez que foi o material que originou os melhores resultados em termos de eficiência de ligação da espécie metálica e de reação subsequente com o antibiótico.

(b) Pré-tratamento do Rayon

Uma das limitações identificadas no estudo anterior foi a presença de heterogeneidade na superfície do Rayon modificado, patente através da presença de regiões de coloração mais ou menos intensa na mesma zaragatoa. Este comportamento foi atribuído à possível heterogeneidade do material de origem, sugerindo a necessidade da implementação de um pré-tratamento capaz de uniformizar a superfície do material.

Neste sentido, foram testados vários processos de lavagem do derivado de celulose comercial, a implementar antes da sua reação com APTES. Neste estudo incluíram-se lavagens com (i) H_2SO_4 , 0,5 mol/L; (ii) NaOH 0,25 mol/L; (iii) etanol ou (iv) acetonitrilo. Para este efeito, várias zaragatoas foram imersas em cada solução/solvente, durante 12 horas, sendo depois lavadas com água, sujeitas à reação com APTES e posteriormente com Cu^{2+} , e finalmente à reação com CTC. Os resultados obtidos neste pré-tratamento podem ser observados na tabela 3.6.

Tabela 3.6 - Cores observadas para o material APTES/Cu²⁺ e APTES/Cu²⁺/CTC (1,0×10⁻³ mol/L de CTC) sujeito a pré-tratamento por lavagem.

Pré-tratamento	APTES/Cu ²⁺	APTES/Cu ²⁺ /CTC
H ₂ SO ₄ 0,5 mol/L	Possível oxidação do material	----
NaOH 0,25 mol/L		
Etanol		
Acetonitrilo		

A comparação visual dos resultados obtidos permitiu concluir que os materiais sensores APTES/Cu²⁺ lavados com etanol foram os que apresentaram superfícies coradas mais homogêneas, tanto na fase de ligação do cobre como na fase de reação com a CTC. Por sua vez, a lavagem com acetonitrilo permitiu a obtenção de uma tonalidade azul mais intensa na fase de ligação do cobre, mas a reação posterior com CTC deu origem a um amarelo esverdeado heterogêneo, embora também mais intenso. A lavagem do material com H₂SO₄ conferiu ao material uma cor castanha escura, indicando que o material Rayon poderia estar demasiado oxidado, limitando a sua reação posterior com APTES. A lavagem com NaOH também não foi eficaz, esperando-se com esta a remoção de materiais adsorvidos à fibra, além da possível adição de alguns grupos –OH ao Rayon.

Considerando os resultados anteriores, estabeleceu-se um processo de pré-tratamento intermédio, que envolveu etanol e acetonitrilo, visando promover a homogeneidade do material e facilitar a comparação visual dos resultados por comparação direta de cores.







(c) Tempo de reação

De modo a testar a influência do tempo na reação entre o Rayon modificado com APTES 10% e o Cu^{2+} , as zaragatoas com APTES foram imersas durante 30 minutos, 1 hora ou 2 horas numa solução aquosa de Cu^{2+} . Após lavagem com água e secagem, mergulharam-se novamente os materiais, desta vez em CTC, numa concentração de $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L. Os resultados obtidos podem ser consultados na tabela 3.7.

Ao observar as cores obtidas foi possível concluir que a cor decorrente da presença do metal não se intensificou, mesmo quando a zaragatoa foi mergulhada numa solução metálica por 2 horas. Neste caso, a cor resultante da reação do material sensor com a CTC parece intensificar-se com o aumento de tempo de imersão, mas a superfície do material não é uniforme.

De uma forma geral, os resultados indicam que a reação deverá ser rápida, pois as cores observadas aos 30 minutos foram intensas e não se alteraram com o prolongamento da incubação até aos 240 minutos. Desta forma, concluiu-se que a utilização de 30 minutos como tempo de imersão foi suficiente para obtermos os resultados espectáveis, constituindo assim uma vantagem na construção do sensor.

Tabela 3.7 - Evolução de cores do material sensor APTES/ Cu^{2+} , com diferentes tempos de reação entre o Rayon modificado com APTES e o Cu^{2+} .

CTC (mol /L)	Tempo de reação Cu^{2+} /CTC		
	30 min	60 min	120 min.
—			
$1,0 \times 10^{-3}$			




(d) Temperatura

O efeito da temperatura foi avaliado para a reação de adsorção do cobre ao Rayon modificado com APTES, pensando-se nesta altura que a temperatura poderia contribuir para uma maior uniformização da reação e subsequente homogeneização da cor observada.

A necessidade deste estudo surgiu na sequência de se ter constatado que a reação da espécie metálica com o Rayon ocorria apenas na superfície externa da fibra. Quando se efetuou um corte transversal na fibra do Rayon verificou-se que havia apenas um filme fino corado externamente, permanecendo a matriz interna do Rayon com a cor original. A imposição de temperatura ao ensaio visou, por isso, aumentar a capacidade de penetração do Cu^{2+} nas fibras de Rayon.

Assim, as zaragatoas foram mergulhadas em Cu^{2+} , durante 30 minutos, a 40, 50 e 60 °C, incubando-as posteriormente, por 30 minutos, numa solução de CTC com uma concentração igual a $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L. Os resultados obtidos para o corte transversal da zaragatoa estão presentes na tabela 3.8. Na incubação de Cu^{2+} a 40°C durante 30 minutos, obtiveram-se cores mais homogêneas comparativamente aos materiais mergulhados a 50°C e a 60°C. A dificuldade de penetração dos reagentes pelo interior do Rayon poderia estar associada ao processo de compactação da fibra aquando da produção de zaragatoas. A ser assim, o processo de modificação da fibra poderia ser favoravelmente implementado antes da sua modificação na zaragatoa (na qual o Rayon estava já compactado). Por ausência de acesso à fibra “livre”, este teste não foi realizado no contexto desta dissertação, mas pensa-se que poderá ser objeto de estudo posterior, tendo em vista melhorar todo o processo implementado.

Tabela 3.8 - Evolução de cores do material sensor APTES/Cu²⁺, com diferentes temperaturas de incubação entre o Rayon modificado com APTES e o Cu²⁺.







CTC (mol /L)	Temperatura de incubação (°C)		
	40	50	60
1,0×10 ⁻³			

Uma vez que, a implementação da reação entre o Rayon modificado com APTES e o cobre a uma temperatura de 40°C, também contribuiu para a homogeneidade da superfície do Rayon, os estudos seguintes foram realizados nesta condição.

(e) Concentração da espécie metálica

Tendo em vista aumentar a quantidade de cobre divalente ligado à fibra de Rayon com APTES, procedeu-se de seguida ao estudo do efeito da concentração da espécie metálica em solução aquosa na intensidade da cor formada, com e sem CTC. A concentração da espécie metálica testada variou entre 1,0×10⁻¹ e 1,0×10⁻³ mol/L, e os resultados são apresentados tabela 3.9.

Tabela 3.9- Evolução de cores do material sensor APTES/Cu²⁺ com e sem CTC, para diferentes concentrações de Cu²⁺ a reagirem com o Rayon modificado com APTES.

CTC (mol /L)	Cu ²⁺ (mol/L)		
	1,0×10 ⁻¹	1,0×10 ⁻²	1,0×10 ⁻³
—			
1,0×10 ⁻³			

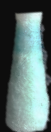





Por comparação visual dos resultados obtidos, concluiu-se que a intensidade da cor vai aumentando à medida que a concentração de espécie metálica disponível também aumenta. Por análise da tabela 3.9, as imagens obtidas para a concentração de $1,0 \times 10^{-2}$ mol/L revelariam que esta seria a melhor concentração a aplicar e demonstraram que a aquisição de imagem não foi a melhor. Para prosseguimento do trabalho, as diferenças mais significativas comparando visualmente os sensores sem CTC e com CTC, foram obtidas com as soluções cuja concentração de metal é mais elevada. Assim, as modificações do Rayon, posteriores foram realizadas com soluções de Cu^{2+} de concentração igual a $1,0 \times 10^{-1}$ mol/L.

(f) Tempo de reação do APTES

Definiu-se desde o início, que o tempo de reação do APTES para a modificação da superfície seria de 3 horas, por consulta da literatura [10]. De modo a reduzir este período e dado que a superfície a modificar foi diferente à presente na literatura, testou-se nesta fase, o efeito do tempo da reação do APTES na extensão desta reação na fibra de Rayon

Os tempos selecionados variaram entre 1, 3 e 6 horas, e a concentração de antibiótico testada manteve-se em $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L. Os resultados obtidos, encontram-se indicados na tabela 3.10.

Tabela 3.10- Evolução de cores do material sensor APTES/ Cu^{2+} com e sem CTC, para diferentes tempos de reação entre o Rayon modificado e o APTES.

CTC (mol /L)	Tempo de reação APTES		
	1 h	3 h	6 h
-			
$1,0 \times 10^{-3}$			

Pelos resultados obtidos, verificou-se que a cor foi mais intensa quando se aumentou o tempo de reação do APTES de 1h para 3h. Apesar de haver reação ao final de 1 hora, a intensidade das cores aumentou de forma evidente quando a reação foi prolongada até às 3 horas. O aumento do tempo de reação para 6h não originou, porém, diferenças significativas mas a cor também não se intensificou, não sendo vantajoso nem justificável este aumento. Neste sentido, fixou-se o tempo de reação do APTES nas 3 horas.

3.4. Controlo da modificação do Rayon (FTIR)

Durante o procedimento de modificação do Rayon, houve um sensor produzido para o controlo da modificação através da análise da superfície por FTIR. Os espectros presentes na Figura 3.2, resultam dos ensaios de 3 horas para a modificação de Rayon por utilização de APTES a 10% em etanol.

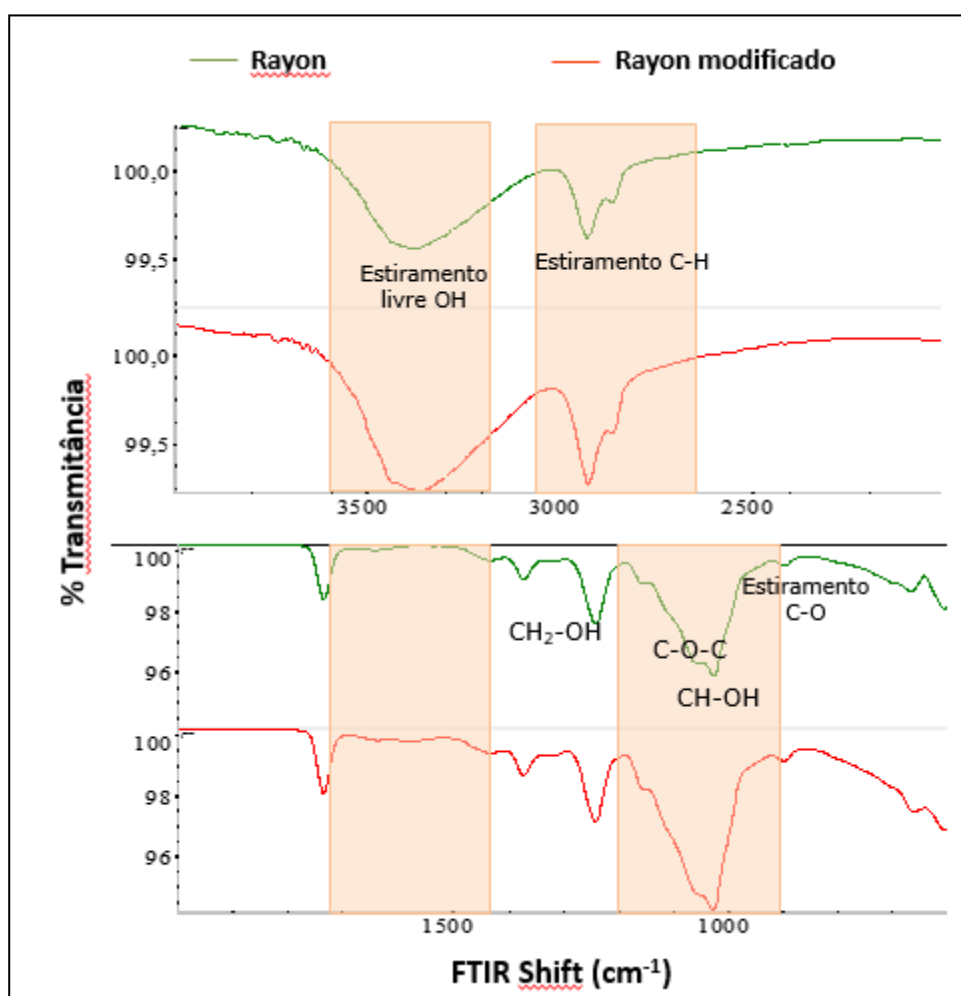


Figura 3.2- Espectros de FTIR relativos às modificações ocorridas no Rayon para a reação entre o Rayon e o APTES.

O espectro de FTIR de Rayon revelou as características gerais dos materiais celulósicos, nomeadamente a ampla e intensa banda de estiramento da ligação O–H, entre cerca de 3000 a 3700 cm^{-1} , e a banda de estiramento decorrente da ligação C–O entre 1000-1100 cm^{-1} . O espectro apresentou ainda bandas de fraca intensidade, localizadas a cerca de 1400 e 1350 cm^{-1} , tipicamente associadas a vibrações de deformação angular do grupo OH.

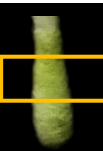

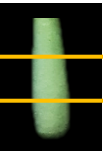

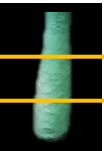
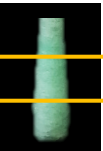



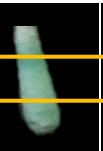



O espectro de FTIR do Rayon modificado com APTES foi semelhante ao espectro do Rayon simples, existindo, contudo, duas alterações que revelaram a presença do APTES na fibra. Uma dessas alterações localizou-se a cerca de 1600 cm^{-1} , traduzida numa pequena curvatura da linha de base e que deu origem numa banda ligeira. Esta banda correspondeu, provavelmente, à deformação angular do grupo NH, tipicamente de forte intensidade, mas que aqui se apresentava em reduzida quantidade face ao reduzido número de grupos com NH relativamente à restante composição do material analisado. A outra alteração presente foi o aumento da intensidade do pico observado a cerca de 1050 cm^{-1} . Este aumento relacionou-se com o estiramento da ligação Si–O–C, presente na sequência da reação entre o APTES e o Rayon (na qual o átomo de Si advinha do reagente APTES e o átomo de C advinha da matriz de celulose na fibra).

De uma forma geral, os espectros de FTIR apresentados confirmaram a ocorrência de reação entre o reagente APTES e o Rayon.

3.5. Calibração do Sensor

De modo a estabelecer uma relação matemática entre a concentração do antibiótico e a cor observada, foi necessário recorrer à elaboração de uma reta de calibração do material, incubando-o em soluções com diferentes concentrações de CTC. A variação de cores observada foi registada através de imagem digital e está presente na Tabela 3.11. Para efeitos quantitativos, a imagem foi aberta no programa Paint (Windows) e retiraram-se as coordenadas da cor segundo o modelo HSL, escolhendo 3 pontos aleatórios da área mais homogénea – assinalada na Tabela.

Tabela 3.11- Cores dos sensores APTES/Cu²⁺/CTC com concentrações diferentes de CTC (região assinalada relativa à zona de leitura das coordenadas HSL no programa Paint)

												
1,0 $\times 10^{-3}$	5,0 $\times 10^{-4}$	1,0 $\times 10^{-4}$	5,0 $\times 10^{-5}$	1,0 $\times 10^{-5}$	5,0 $\times 10^{-6}$	1,0 $\times 10^{-6}$	5,0 $\times 10^{-7}$	1,0 $\times 10^{-7}$	5,0 $\times 10^{-8}$	1,0 $\times 10^{-8}$	5,0 $\times 10^{-9}$	Controlo

Os valores das coordenadas assim obtidos estão presentes na tabela 3.12 e corresponderam à média da leitura dos 3 pontos escolhidos do material sensor APTES/Cu²⁺/CTC incubado numa dada concentração de CTC ou em água. Os pontos recolhidos para o cálculo dos valores médios encontram-se indicados na tabela B.1, em anexo.

Tabela 3.12- Média das coordenadas de cor obtidas da imagem dos sensores APTES/Cu²⁺ incubados em diferentes concentrações de CTC.

CTC (mol/L)	Tonalidade (H)	Saturação (S)	Luminosidade (L)	Log (2×H+L))
1,0×10⁻³	45	106	117	2.32
5,0×10⁻⁴	49	91	125	2.36
1,0×10⁻⁴	67	83	156	2.46
5,0×10⁻⁵	87	54	125	2.49
1,0×10⁻⁵	104	84	123	2.53
5,0×10⁻⁶	105	98	165	2.58
1,0×10⁻⁶	107	89	138	2.55
5,0×10⁻⁷	111	125	175	2.59
1,0×10⁻⁷	113	112	173	2.60
5,0×10⁻⁸	103	59	125	2.52
1,0×10⁻⁸	103	66	163	2.58
5,0×10⁻⁹	100	61	189	2.59

Primeiramente procurou-se estabelecer uma relação linear entre a concentração de CTC e cada uma das coordenadas, individualmente. Não se verificou esta relação, optando-se por diversas abordagens matemáticas de transformação de coordenadas. A abordagem mais próxima de uma tendência linear foi o logaritmo da soma de duas vezes a tonalidade mais a luminosidade, em função do logaritmo da concentração de CTC. A regressão linear obtida para o sensor pode ser observada na Figura 3.3.

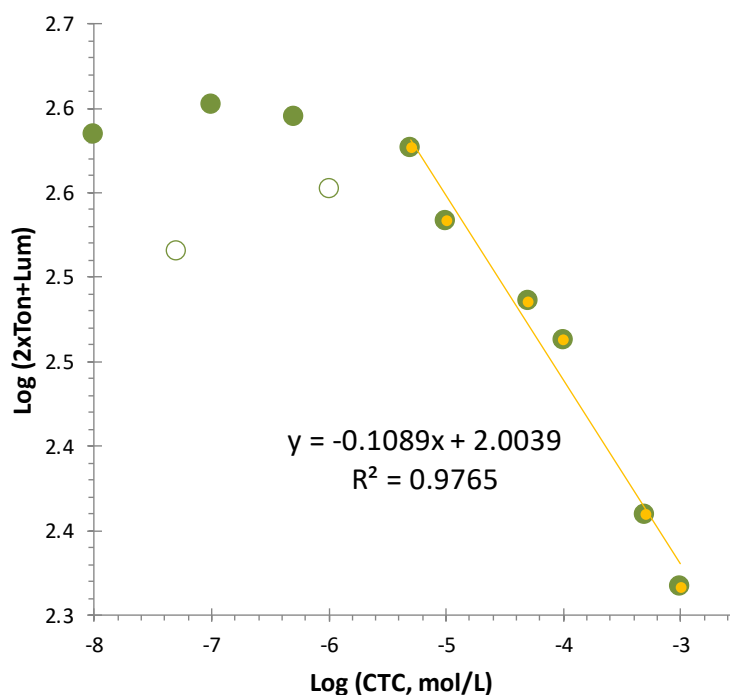


Figura 3.3- Curva de calibração do sensor APTES/Cu²⁺/CTC





De uma forma geral, o comportamento linear foi registado para concentrações de CTC compreendidas entre $5,0 \times 10^{-6}$ e $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L. O coeficiente de correlação linear está distante do valor unitário ideal, mas foi importante perceber-se que estes valores foram obtidos a partir de coordenadas circulares, que nada se enquadram com o comportamento linear desejado. O limite de deteção foi aqui identificado como a concentração correspondente ao ponto no eixo das abcissas correspondente ao ponto de cruzamento entre o segmento linear traçado fora da região de calibração (e virtualmente uma paralela ao eixo das abcissas) e o prolongamento da reta de calibração. O valor aqui obtido foi igual a $4,45 \times 10^{-6}$ mol/L.

3.6. Seletividade do Sensor

Considerando que o sensor iria ser aplicado a amostras reais ou com características próximas às reais, foi importante testar a resposta do sensor a outros antibióticos. Para isso, a zaragatoa com o material sensor foi mergulhada em soluções individuais de outros antibióticos, também utilizados em sistemas de aquacultura. Para este estudo foram escolhidos os antibióticos seguintes: cloranfenicol, amoxicilina e norfloxacin, com uma concentração

igual a $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L. Os resultados obtidos foram apresentados na tabela 3.13.

Tabela 3.13 - Resposta corada do material sensor APTES/Cu²⁺ a outros antibióticos.

Controlo	Antibiótico ($1,0 \times 10^{-3}$ mol/L)		
	Cloranfenicol	Amoxicilina	Norfloxacina
			

Analizando os resultados patentes na tabela anterior, foi possível verificar-se que não houve qualquer alteração da cor do sensor após contacto com os antibióticos estudados, exceto para a amoxicilina, a qual provocou uma alteração ligeira na cor azul, dando origem a regiões com um amarelo claro. Apesar disso, a reação não foi igual àquela observada para a CTC, pois a cor foi diferente e a intensidade também.

Neste sentido, os resultados aqui obtidos indicaram que a mudança de cor de azul para amarelo esverdeado do material sensor representou um comportamento seletivo da zaragatoa modificada para com a CTC. Efetivamente, a variação de cor indicada denunciou a presença de CTC, mesmo se na presença dos demais antibióticos testados uma vez que estes últimos não causaram alteração significativa na cor original do material sensor. No entanto, importa realçar que não foi possível assegurar que a resposta seletiva registada fosse apenas dirigida para a CTC, uma vez que não foram incluídos neste estudo outros antibióticos do grupo das tetraciclina.

3.7. Aplicabilidade do Sensor

O Rayon foi sujeito a testes de aplicabilidade nas amostras seguintes: (i) água do aquário da BioMark; (ii) truta de aquacultura; (iii) e frango de aviário. A água de aquário foi utilizada na sequência da ausência de acesso a estações de aquacultura. A escolha da truta e do frango decorreu do uso comum de

tetraciclinas na produção/alimentação destas espécies em unidades de produção animal, tendo sido adquiridas numa superfície comercial.



Relativamente à água de aquário, esta amostra foi recolhida diretamente do aquário existente no laboratório, cuja água é renovada quinzenalmente e no qual não haviam sido aplicados produtos farmacêuticos. Pretendeu-se simular assim a possível interferência decorrente dos excrementos de peixe e do seu alimento, colocando os flocos diretamente na água. A amostra recolhida foi então dopada com CTC de modo a produzir concentrações iguais a $1,0 \times 10^{-3}$ e $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L. De uma forma geral, estas concentrações relacionam-se com os níveis de antibiótico que podem existir nas águas. A CTC pode ser dada aos peixes por imersão, injeção ou em alimentos para animais, pode ser utilizado isoladamente ou combinado com outros fármacos do mesmo grupo (oxitetraciclina, tetraciclina, etc) e a dose exata depende de vários fatores, incluindo as espécies, condição de doença, etc. Assumindo como modo de administração a imersão como referência, neste caso, o fármaco é uniformemente distribuído na água e os valores de referência deste são 200-700mg/litro de água por 2-6 horas (de acordo com drogas aprovadas pela FDA para a aquacultura nos EUA em 2007) [42].

Relativamente às amostras de alimentos, a matriz sólida do peixe e do frango foi tratada conforme descrito na secção 2.7. Considerou-se que a matriz líquida resultante do tratamento realizado não apresentava antibiótico, sendo posteriormente diluída 2,5 vezes e dopada com concentração de $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L. Os níveis de limites máximos de resíduos de CTC em alimentos é de 100µg CTC/kg tecido ($\pm 1,55 \times 10^{-8}$ mol/L, para a massa de tecido utilizada), valor de referência para o músculo de todas as espécies produtoras de alimento [43]. Avaliando que esta mesma concentração se encontra fora da gama de linearidade optou-se por avaliar uma concentração que estivesse na gama de linearidade.

Os resultados obtidos em ambas as abordagens estão presentes na tabela 3.14. Apresentaram-se aqui as coordenadas resultantes das imagens digitais obtidas em cada condição avaliada, correspondentes às médias dos valores das coordenadas (dados apresentados nas tabelas B1 a B3, em anexo), recolhidas em 3 pontos aleatórios da zona mais homogénea da

superfície do sensor (assinaladas nessa tabela pelo quadrado amarelo). Apresentaram-se ainda os valores de concentração correspondentes, calculados através de curva de calibração indicada anteriormente. Os valores experimentais obtidos foram também apresentados em sobreposição à curva de calibração utilizada e representados nas figuras 3.4 a 3.6.

Tabela 3.14 - Resposta colorimétrica do material sensor à presença de CTC em amostras ambientais e de alimentos dopadas, com a correspondente concentração calculada via curva de calibração anterior.

Cor observada				
Controlo	$1,0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$			$1,0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$
Amostra	Água de aquário	Frango de aviário	Truta de Aquacultura	Água do aquário
Tonalidade	51	49	51	58
Luminosidade	113	116	105	166
Concentração (mol/L)	$9,6 \times 10^{-4}$	$1,0 \times 10^{-3}$	$1,4 \times 10^{-3}$	$8,1 \times 10^{-5}$

De um modo geral, analisando os resultados obtidos para as concentrações iguais a $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ CTC, os sensores forneceram os resultados próximos dos esperados (cores idênticas), com valores centrados na

concentração dopada. Em termos absolutos, o erro não se conteve ao intervalo de 5% desejado, mas foi claro que os erros associados à captura das imagens (num momento diferente da curva de calibração), à utilização de coordenadas de cor e à presença de uma escala de concentração logarítmica contribuíram para os resultados obtidos. O mesmo comentário pode ser tecido relativamente à concentração inferior no caso da água do aquário.

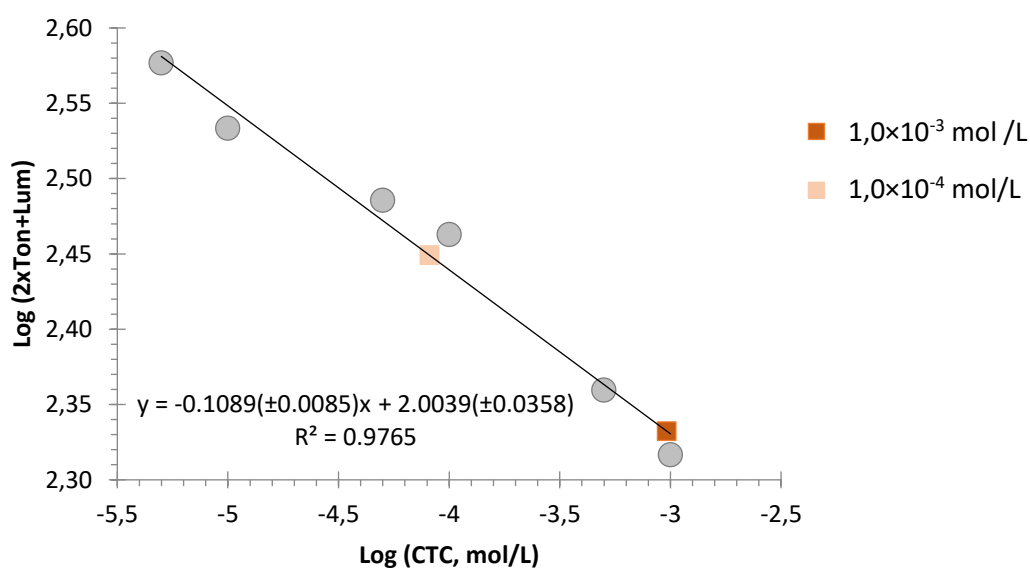


Figura 3.4 - Sobreposição das concentrações determinadas para a amostra dopada de água de aquário na curva de calibração do material sensor APTES/CU²⁺ otimizado.

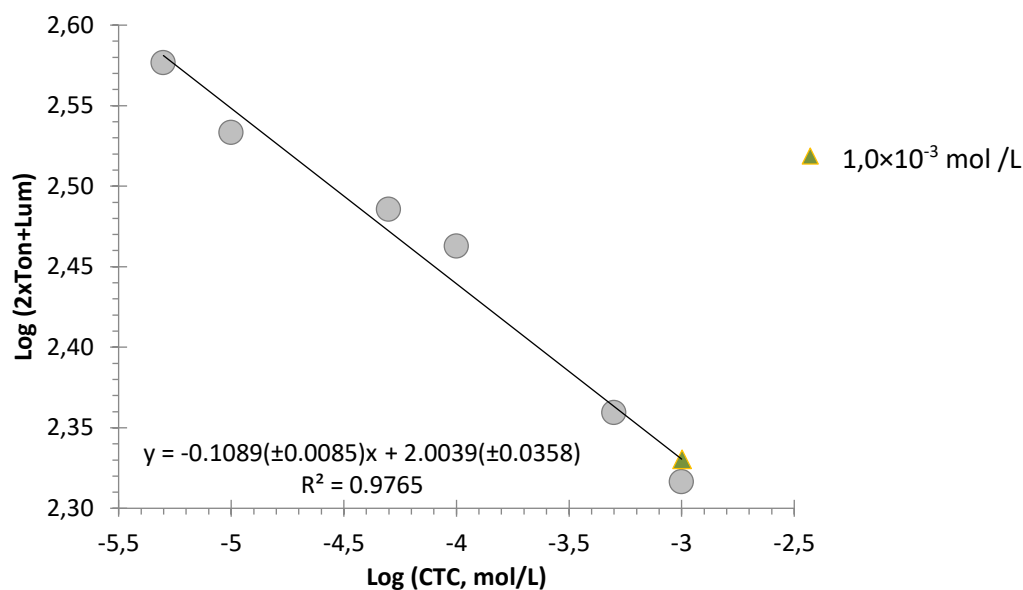


Figura 3.5- Sobreposição da concentração determinada para a amostra dopada de frango de aviário na curva de calibração do material sensor APTES/CU²⁺ otimizado.

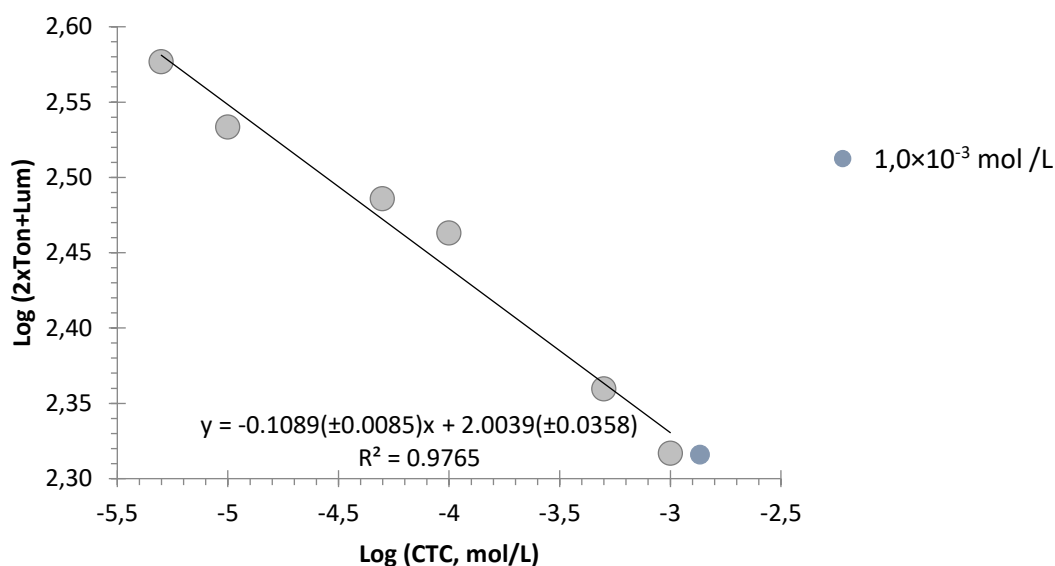


Figura 3.6 - Sobreposição da concentração determinada para a amostra dopada de truta de aquacultura na curva de calibração do material sensor APTES/CU²⁺ otimizado.

Por análise dos resultados obtidos, pode dizer-se que o sensor APTES/Cu²⁺ pode controlar os níveis iniciais e decaimento do fármaco em água (evitando, assim, a adição de uma quantidade superior do fármaco). O limite inferior para o antibiótico em água não se encontra estabelecido. Após o tratamento, a principal ação é colocar o peixe em quarentena e nenhum

monitoramento do nível de antibiótico é exigido. O uso regular de antibióticos na aquacultura não é permitido, contudo estes são usados para melhorar a sobrevivência dos peixes e ao mesmo tempo atuar como alimento. Assim, este sensor destina-se a ajudar os produtores a controlar o nível de antibiótico a ser utilizado e definir este nível para um mínimo.

4. Conclusões e Trabalhos Futuros

Neste trabalho modificou-se com sucesso a fibra de Rayon em zaragatoas, sensibilizando-as à presença da CTC através de uma mudança de cor, decorrente da reação entre o antibiótico e uma espécie metálica presente na fibra.

As espécies metálicas Fe^{3+} , Ag^+ , Cu^{2+} , MnO_4^- , Al^{3+} e *legofer* foram capazes de originar reações coradas com o antibiótico em estudo, identificando-se as espécies Fe^{3+} e Cu^{2+} como as mais sensíveis. Estas espécies ficaram ligadas à fibra de Rayon, através de grupos amina presentes na sequência da reação do Rayon com APTES. O contacto das zaragatoas modificadas com a CTC originou uma variação de cor de azul para amarelo esverdeado.

A otimização do processo de modificação das zaragatoas permitiu ainda ter variações de cor mais sensíveis e padrões de fibra mais homogêneos. Dentro deste processo, concluiu-se que a fibra deveria ser sujeita a uma pré-lavagem com etanol e acetonitrilo, para que o material seja depois tratado com APTES a 10% durante 3 horas. Após esta fase, as fibras deverão ser mergulhadas na espécie metálica (neste caso, a espécie metálica que melhor se adequou ao sensor foi o Cobre, após observação dos resultados) durante 30 minutos, sobre o efeito da temperatura a 40°C. Para se obter melhores resultados, em termos colorimétricos, concluiu-se que a concentração da espécie metálica a utilizar deveria ser $1,0 \times 10^{-1}$ mol/L.

A incubação das zaragatoas modificadas nas condições ótimas permitiu obter variações de cor perceptíveis a olho nú. Após tratamento matemático das coordenadas de cor, foi ainda possível estabelecer uma relação linear entre a cor e a concentração de CTC, entre $5,0 \times 10^{-6}$ e $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L. A concentração de CTC detetada nestas condições foi igual a $4,45 \times 10^{-6}$ mol/L.

Quando se testou a resposta do sensor noutros antibióticos, foi possível detetar variações ténues de cor apenas na presença da amoxicilina, sendo o material insensível aos antibióticos cloranfenicol e norfloxacin.

De uma forma geral, a zaragatoa otimizada permitiu o desenvolvimento de um método rápido, com aplicabilidade no local, a amostras de água ou

alimentos, embora seja necessário implementar ainda testes noutra tipo de amostras e noutros níveis de concentração.

De uma forma geral, o método desenvolvido requer ainda procedimentos de otimização tendo em vista reduzir o limite de deteção e aumentar a sensibilidade. A contaminação de antibióticos em alimentos é realizada em concentrações francamente reduzidas (a bem de todos), sugerindo por isso essa necessidade de reduzir o limite de deteção do método. Por outro lado, a redução do limite de deteção impõe um aumento da variação de cor observada entre concentrações de CTC próximas, sob pena de não ser possível discriminar valores quantitativos, ou até semi-quantitativos, através da manipulação das coordenadas de cor.

É fundamental, que existam meios de prevenção e controlo da contaminação bacteriana, em unidades de alimentação coletiva, sendo necessário chamar a atenção para o uso de boas práticas que evitem ao máximo a contaminação cruzada e que se utilizem temperaturas de confeção adequadas, de modo a evitar a disseminação das bactérias portadoras de genes de resistência a antibióticos.

Porém seria importante que o controlo comesse desde a produção do alimento. Tendo em conta, a falta de legislação, em termos de dosagem de antibióticos em aquacultura, este trabalho representa uma proposta inovadora e um pequeno passo para que no futuro o controlo das dosagens seja implementado.

Referências Bibliográficas

1. A ASAE na Defesa do Consumidor, da Saúde Pública e da livre concorrência. Nº4 edition: ASAE; 2015.
2. Mestre PMG: Elaboração de um projecto de uma unidade de piscicultura. 2008.
3. Regulamento (CE) nº2792/1999 do Conselho de 17 de Dezembro de 1999, que define os critérios e condições das ações estruturais do setor das pescas. JO L 337 de 30/12/1999 edition. pp. 29-33; 1999:29-33.
4. (INE) INdE: Estatísticas da Pesca 2011. . ed. Direção-Geral de Recursos Naturais SeSMT edition; 2011.
5. Factos e Números sobre a Política Comum da Pesca [<https://infoeuropa.eu/rocid.pt/registo/000045981/documento/0001/>]
6. Organization WH, Aquaculture JFNWSGoFSIAwPf: *Food safety issues associated with products from aquaculture: report of a joint FAO/NACA/WHO study group*. World Health Organization; 1999.
7. Europeia C: Métodos de aquicultura. 2012.
8. Pereira JIO: Avaliação da qualidade e segurança microbiológica de trutas de aquicultura. 2013.
9. Gomes HIAS, Sales MGF: Development of paper-based color test-strip for drug detection in aquatic environment: Application to oxytetracycline. *Biosensors and Bioelectronics* 2015, 65:54-61.
10. Vilaine R: The foodservice market s interest in aquaculture products: The example of France. *Cahiers Options Méditerranéennes* 2002, 59:83-86.
11. SustainAqua: SustainAqua handbook - A handbook for sustainable aquaculture. 2009.
12. FAO: The State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA). 2010.
13. Shaw S, Gabbott M: The development of trout markets and marketing with particular reference to the European experience. *Aquaculture* 1992, 100:11-24.
14. Organization WH: Antimicrobial use in aquaculture and antimicrobial resistance. *Report of a Joint FAO/OIE/WHO Expert Consultation on*

- Antimicrobial Use in Aquaculture and Antimicrobial Resistance Seoul, Republic of Korea* 2006:5-17.
15. (EFSA) EFSA: Foodborne antimicrobial resistance as a biological hazard. *The EFSA Journal* 2008:765:762-787.
 16. Monteiro SH: Ocorrência de antibióticos e estudo de resistência microbiana em sistemas aquaculturais do Rio Paraná, Reservatório de Ilha Solteira, na região de Santa Fé do Sul, estado de São Paulo. Universidade de São Paulo, 2014.
 17. Cabello FC: Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental microbiology* 2006, 8:1137-1144.
 18. Organization WH: *Tackling antibiotic resistance from a food safety perspective in Europe*. World Health Organization; 2011.
 19. Heuer OE, Kruse H, Grave K, Collignon P, Karunasagar I, Angulo FJ: Human health consequences of use of antimicrobial agents in aquaculture. *Clinical Infectious Diseases* 2009, 49:1248-1253.
 20. Schnick RA: International harmonization of antimicrobial sensitivity determination for aquaculture drugs. *Aquaculture* 2001, 196:277-288.
 21. Shome R, Shome B: Antibiotic resistance pattern of fish bacteria from freshwater and marine sources in Andamans. *Indian Journal of Fisheries* 1999, 46:49-56.
 22. Lawrence JG: Horizontal and vertical gene transfer: the life history of pathogens. In *Concepts in Bacterial Virulence. Volume 12*: Karger Publishers; 2004: 255-271
 23. Teuber M: Veterinary use and antibiotic resistance. *Current opinion in microbiology* 2001, 4:493-499.
 24. Frappalo P, Guest G: Regulatory status of tetracyclines, penicillin and other antibacterial drugs in animal feeds. *Journal of Animal Science* 1986, 62:86-91.
 25. WHO: Critically important antimicrobials for human medicine. 3rd Edition ed. Zoonoses DoFSa.
 26. Veiga A, Lopes A, Carrilho E, Silva L, Dias M, Seabra M, Borges M, Fernandes P, Nunes S: Perfil de risco dos principais alimentos

- consumidos em Portugal. *Autoridade de Segurança Alimentar e Económica* 2009:01-330.
27. Cabello FC: Antibióticos y acuicultura en Chile: consecuencias para la salud humana y animal. *Revista médica de Chile* 2004, 132:1001-1006.
 28. Melo FMdS: Utilização de técnicas microbiológicas na avaliação da eficiência de um sistema de HACCP a nível de adega. 2011.
 29. de Bastos LPF: Avaliação da capacidade de detecção de resíduos de antimicrobianos no leite por um método de inibição microbiana. 2012.
 30. Orlando EA: Resíduos de antibióticos tetraciclínicos em músculo de peixe: comparação de diversos métodos de extração e avaliação por HPLC. 2013.
 31. Taghdisi SM, Danesh NM, Ramezani M, Abnous K: A novel M-shape electrochemical aptasensor for ultrasensitive detection of tetracyclines. *Biosensors and Bioelectronics* 2016, 85:509-514.
 32. Wong A, Scontrì M, Materon EM, Lanza MR, Sotomayor MD: Development and application of an electrochemical sensor modified with multi-walled carbon nanotubes and graphene oxide for the sensitive and selective detection of tetracycline. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 2015, 757:250-257.
 33. Zhao H, Wang H, Quan X, Tan F: Amperometric sensor for tetracycline determination based on molecularly imprinted technique. *Procedia Environmental Sciences* 2013, 18:249-257.
 34. Moreira FT, Sales MGF: Biomimetic sensors of molecularly-imprinted polymers for chlorpromazine determination. *Materials Science and Engineering: C* 2011, 31:1121-1128.
 35. Lara FJ, García-Campaña AM, Neusüss C, Alés-Barrero F: Determination of sulfonamide residues in water samples by in-line solid-phase extraction-capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* 2009, 1216:3372-3379.
 36. Guerreiro JRL, Sales MGF: Disposable solid state probe for optical screening of chlorpromazine. *Microchimica Acta* 2011, 175:323-331.

37. Silva T: Desenvolvimento de um sensor óptico para determinação de Norfloxacin. Instituto Politécnico do Porto. Instituto Superior de Engenharia do Porto, 2010.
38. Jan C.A. B. SDT: Color Vision. *Journal of Chemical Crystallography* 2005;pp. 433-439.
39. Dutra RF, Mendes RK, da Silva VL, Kubota LT: Surface plasmon resonance immunosensor for human cardiac troponin T based on self-assembled monolayer. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 2007, 43:1744-1750.
40. Guerreiro J, Freitas V, Sales MGF: New sensing materials of molecularly-imprinted polymers for the selective recognition of chlortetracycline. *Microchemical Journal* 2011, 97:173-181.
41. Môzelo C: Relatório de Atividade Científica. 2013.
42. FDA-CVM: FDA website
[<https://www.fda.gov/cvm/aqualibtoc.htm#ApprovedDrugs>.] 2007
43. REGULATION HAT: Council Regulation (EEC) No 2377/90 of 26 June 1990 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. *Official Journal L* 1990, 224:0001-0008.

Bibliografia consultada:

- a. European Commission. Imports of animals and food of animal origin from non-EU countries: Provisions of guarantees equivalent to EU requirements on residues of veterinary medicines, pesticides and contaminants; 2012.
- b. T Defoirdt, P Sorgeloos, P Bossier, *Current Opinion in Microbiology*, 14, 251-258, 2011.
- c. S Fairchild, JL Smith, U Idris, J Lu, S Sanchez, LB Purvis, C Hofacre, MD Lee, *Effects of Orally Administered Tetracycline on the Intestinal Community Structure of Chickens and on tet Determinant Carriage by Commensal Bacteria and Campylobacter jejuni*, 2005

ANEXO A

Tabelas - Otimização do sensor

Tabela A.1- Modificação do Rayon (■ - contém □ - não contém)

Metal	Ensaio	APTES ou cisteamina (3 horas)	Espécie Metálica (Fe ³⁺ /Cu ²⁺ /Legofer) 30 minutos	CTC (1,0×10 ⁻³ mol/L)	CTC (1,0×10 ⁻⁴ mol/L)
Ferro	A1	■	□	□	□
	A2	■	■	□	□
	A3	■	□	■	□
	A4	■	■	■	□
	A5	■	■	□	■
Cobre	B1	Igual A1	□	□	□
	B2	■	■	□	□
	B3	Igual A3	□	■	□
	B4	■	■	■	□
	B5	■	■	□	■
Legofer	C1	Igual A1	□	□	□
	C2	■	■	□	□
	C3	Igual A3	□	■	□
	C4	■	■	■	□
	C5	■	■	□	■

Tabela A.2- Tempo de contacto com a espécie metálica

(■ - contém ■ - não contém)

Pré-tratamento						
Etanol (12 horas)	Acetonitrilo (12 horas)	APTES 10% (3 horas)	Cu ²⁺ 30 minutos	Cu ²⁺ 1 hora	Cu ²⁺ 2 horas	CTC (1,0x10 ⁻³ mol/L)
		■	■	■	■	■
		■	■	■	■	■
		■	■	■	■	■
		■	■	■	■	■
		■	■	■	■	■
		■	■	■	■	■
		■	■	■	■	■

ANEXO B

Pontos aleatórios recolhidos – tonalidade, saturação e luminosidade

Tabela B.1 - Recolha de pontos aleatórios para cálculo da média das coordenadas de cor.

Amostra	Concentração CTC (mol/L)	Após CTC		
		Tonalidade	Saturação	Luminosidade
E1	$1,0 \times 10^{-3}$	45	109	120
		46	110	108
		45	109	122
E2	$5,0 \times 10^{-4}$	51	92	133
		48	89	113
		47	92	130
E3	$1,0 \times 10^{-4}$	67	86	162
		68	84	153
		67	80	152
E4	$5,0 \times 10^{-5}$	83	51	112
		89	54	126
		89	56	138
E5	$1,0 \times 10^{-5}$	102	82	104
		105	83	132
		104	86	133
E6	$5,0 \times 10^{-6}$	104	100	168
		106	101	168
		104	94	160
E7	$1,0 \times 10^{-6}$	109	94	141
		107	91	140
		106	83	134
E8	$5,0 \times 10^{-7}$	112	123	170
		111	129	183
		111	122	171
E9	$1,0 \times 10^{-7}$	113	108	170
		113	115	175
		113	112	173
E10	$5,0 \times 10^{-8}$	103	63	132
		104	56	121
		102	57	123
E11	$1,0 \times 10^{-8}$	98	59	144
		106	70	172
		106	70	172
E12	$5,0 \times 10^{-9}$	99	65	186
		99	57	194
		102	62	187

ANEXO C

Tabelas de cálculo da concentração da amostra experimental

Tabela C.1- Cálculo da concentração da amostra experimental da água do aquário.

Concentração dopagem (mol/L)	Tonalidade (L)	Média Ton	Luminosidade	Média Lum	$\log(2 \times T + L)$	LogX	Concentração experimental (mol/L)
$1,0 \times 10^{-3}$	48	51	111	113	2,33	-3.017	9.62×10^{-4}
	52		113				
	51		114				
$1,0 \times 10^{-4}$	58	58	170	166	2,45	-4.089	8.14×10^{-5}
	57		159				
	58		169				

Tabela C.2- Cálculo da concentração da amostra experimental do frango de aviário.

Concentração dopagem (mol/L)	Tonalidade	Média Ton	Luminosidade	Média Lum	$\log(2 \times \text{ton} + \text{lum})$	Log X	Concentração experimental (mol/L)
$1,0 \times 10^{-3}$	51	49	120	116	2,33	-2.998	1×10^{-3}
	41		95				
	49		116				
$1,0 \times 10^{-4}$	97	97	153	153	2,54	-4.926	$1,19 \times 10^{-5}$
	97		147				
	98		161				

Tabela C.3- Cálculo da concentração da amostra experimental da truta de aquacultura.

Concentração dopagem (mol/L)	Tonalidade	Média Ton	Luminosidade	Média Lum	$\log(2 \times \text{ton} + \text{lum})$	Log X	Concentração experimental (mol/L)
$1,0 \times 10^{-3}$	51	51	117	105	2,316	-2.866	1.36×10^{-3}
	49		105				
	57		100				
$1,0 \times 10^{-4}$	96	88	167	170	2,539	-4,914	$1,22 \times 10^{-5}$
	88		174				
	86		170				

